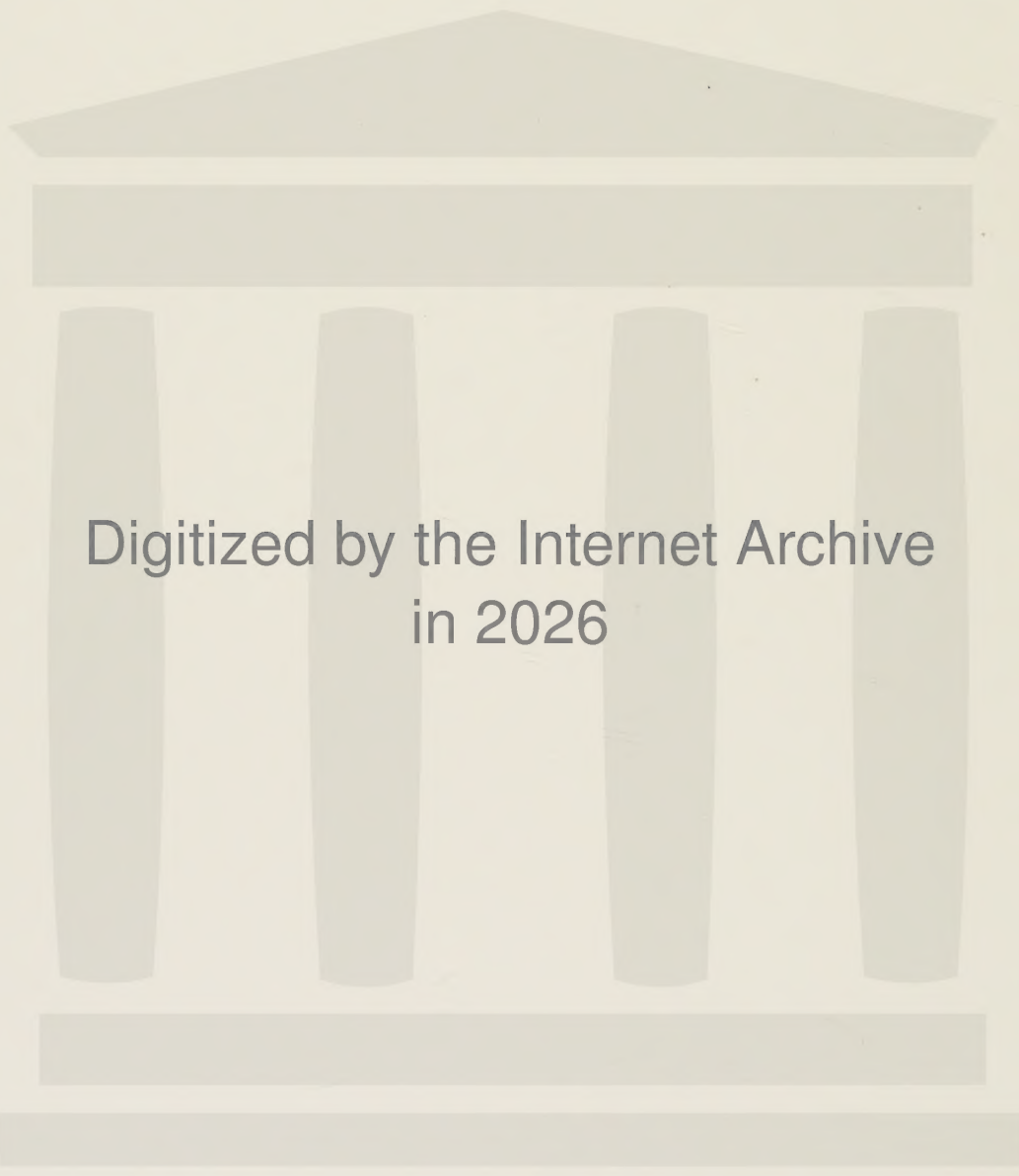


P. Struckmeier.

Frankfurt a M 1981.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41550820_0042

Die Inaktivierung der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung
durch CuSO_4

Inaugural - Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt
dem Fachbereich
Biochemie, Pharmazie und Lebensmittelchemie
der Johann Wolfgang Goethe-Universitaet
zu Frankfurt am Main

von
Peter Struckmeier
Frankfurt am Main 1980

Dekan: Prof. Dr. H. Niebergall

1. Referent: Prof. Dr. H. Fasold

2. Referent: Prof. Dr. H. Rüterjans

Tag der Promotion: 22.1.1981

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für
Biophysikalische Chemie und Biochemie der
Johann Wolfgang Goethe-Universität zu Frankfurt am Main
unter der wissenschaftlichen Leitung von
Herrn Dozent Dr. G. Vierke angefertigt.

Herrn Dr. G. Vierke danke ich für die Themenstellung
sowie die wissenschaftliche und finanzielle Förderung,
die die Durchführung dieser Arbeit ermöglichte.

Den Mitarbeitern des Instituts, insbesondere
Herrn W. Scholz, bin ich für Ratschläge und Diskussionen
dankbar.



Inhaltsverzeichnis

Seite

5 Einleitung

Theoretische Grundlagen

- 6 I) Funktionelle Aspekte der Membran nach der chemiosmotischen Theorie
- 8 II) Die dynamische Struktur der Membran
- III) Photosystem II und das Sauerstoff entwickelnde System
- 14 A) Das Sauerstoff entwickelnde System
- 17 B) Der Aufbau des elektrochemischen Potentialgradienten durch Photosystem II
- 21 IV) Die hemmende Wirkung von Cu(II) auf die Photosynthese

Experimentelle Methoden

- 22 I) Chloroplastenpräparation
- 26 II) Messung der Sauerstoff-Aktivität
- 32 III) Kolorimetrische Bestimmung von Cu(I)
- 33 IV) Messung von Absorptionsänderungen
- 34 V) Fluoreszenz-und Lumineszenzmessungen

Resultate und Interpretationen

- I) Die Stelle der Inhibierung im Photosystem II
- 38 A) Untersuchung von Teilsequenzen des Elektronentransportes
- 40 B) Die Induktion der Fluoreszenz
- 44 C) Die Induktion der Lumineszenz im Millisekundenbereich
- 49 D) Die Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz im Millisekundenbereich
- 54 E) Lokalisierung der inaktivierten Komponente in der Membran
- II) Der Mechanismus der Inhibierung
- 55 Die Abklingkinetik der Lumineszenz
- III) Die Bindung von Cu(II) an ein Membranprotein
- 61 A) Die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung
- 63 B) Die Bestimmung der Bindungsdaten
- 70 C) Die Lumineszenzlöschung

75	D) Die Cu(II)-bindende Gruppe
	IV) <u>Die Kinetik der Inhibierung</u>
77	A) Diffusionsgekoppelte Bindung von Cu(II)
85	B) Die Temperaturabhängigkeit der Inhibierung
	V) <u>Der Cu(II)-reaktive Zustand der Membran</u>
92	A) Die Lichtintensitätsabhängigkeit der Inhibierung
97	B) Die Abhängigkeit der Inhibierung vom Redoxzustand von Photosystem II
99	C) Die Abhängigkeit der Inhibierung vom pH-Gradienten
100	D) Die Abhängigkeit der Inhibierung von der Anregungswellenlänge
102	E) Inhibierung während einer Zentrifugation
105	F) Ein mechanisches Modell der Konformationsänderung
	VI) <u>Bindung und Reduktion von Cu(II) durch die photosynthetische Membran</u>
116	
	Diskussion
	I) <u>Das Modell der Inaktivierung des Sauerstoff entwickelnden Systems</u>
123	A) Der Mechanismus der Inhibierung
127	B) Die SH-Gruppen-Hypothese
129	II) <u>Die Lokalisierung der inaktivierten Komponente</u>
130	III) <u>Die Diffusion der Cu(II)-Ionen an die Bindungsstelle</u>
132	IV) <u>Die Lichtaktivierung des Cu-reaktiven Zustands</u>
135	Zusammenfassung
	Literaturverzeichnis
	Abkürzungsverzeichnis

Einleitung

Die vorliegende Arbeit steht im Rahmen einer weiteren Untersuchung über den Mechanismus der Cu-Toxizität auf Reaktionen der photosynthetischen Membran.

Daß CuSO_4 auf das Wachstum und die Photosynthese von Algen einen hemmenden Einfluß hat, ist seit langem bekannt. Es ist gezeigt worden, daß der photosynthetische Elektronentransport höherer Pflanzen gestört wird; beide Photosysteme sind betroffen. Die empfindlichste Stelle ist offenbar das Sauerstoff entwickelnde Enzymsystem (Cedeno-Maldonado et al. 1972). Eine genaue Bestimmung der betroffenen Komponente ist bisher aber nicht gelungen; sie liegt wahrscheinlich auf der oxidierenden Seite von Photosystem II.

Über den Mechanismus des Inhibierungsprozesses ist wenig bekannt. Die genannten Autoren vermuten, daß die Reaktion von Cu(II) mit SH-Gruppen zur Inaktivierung führt, während spätere Arbeiten (Vierke und Struckmeier 1977, 1978) die Bildung eines Cu-Proteinkomplexes annehmen.

Die Frage nach dem Mechanismus der Inaktivierung und nach der betroffenen Komponente in der Membran zu klären ist wichtig, um eine weitere Fragestellung beantworten zu können: Warum inaktiviert Cu(II) die Sauerstoffentwicklung nur im Licht, nicht aber im Dunkeln?

Von der Antwort ist ein weiterer Beitrag zum Verständnis der Prozesse zu erwarten, die an der photosynthetischen Membran ablaufen.

Um Prozesse am Photosystem II untersuchen zu können, war ein hochempfindliches Laser-Phosphoroskop für Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen bei tiefen Temperaturen zu entwickeln, sowie eine Anlage zur Messung der Sauerstoffentwicklung unter variablen Bedingungen.

Theoretische Grundlagen

I) Funktionelle Aspekte der Membran nach der chemiosmotischen Theorie von Mitchell

Die Forschung über den Prozeß der Photophosphorylierung hat noch kein generell akzeptiertes Bild ergeben, obwohl die meisten Arbeiten inzwischen von Gesichtspunkten der chemiosmotischen Theorie ausgehen.

Die Hypothese einer chemischen Kopplung wird weitgehend dadurch entkräftet, daß ein energiereiches Zwischenprodukt (wie etwa bei der Glycolyse) bisher nicht gefunden werden konnte.

Die chemiosmotische Hypothese, 1961 von dem britischen Biochemiker und Nobelpreis-Träger Peter Mitchell aufgestellt, verzichtet auf das Postulat einzelner energiereicher Zwischenverbindungen und geht statt dessen von einem energiereichen Zustand der Gesamtmembran aus.

Die wesentlichen Thesen lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

- A) Elektronentransport in einer Energie leitenden Membran resultiert in einem elektrogenen Transport von Protonen von einer Seite der Membran auf die andere, sodaß im Gleichgewichtsfall eine elektrochemische Potentialdifferenz über die Protonen undurchlässige Membran aufgebaut wird.
- B) Die Größe des elektrochemischen Potentialgradienten Δp wird angegeben durch die Gleichung:

$$\Delta p = \Delta \Psi - 2,303 \cdot \frac{R \cdot T}{F} \cdot \Delta pH$$

wobei Δp , und $\Delta \Psi$ in mV, ΔpH in pH-Einheiten angegeben werden, und das Symbol Δ eine Differenz zwischen den Phasen auf beiden Seiten der Membran bezeichnet. R, T und F haben die übliche thermodynamische Bedeutung.

- C) Der Protonengradient, der durch den Elektronentransport hergestellt wird, treibt die Synthese von ATP aus ADP und P_i .

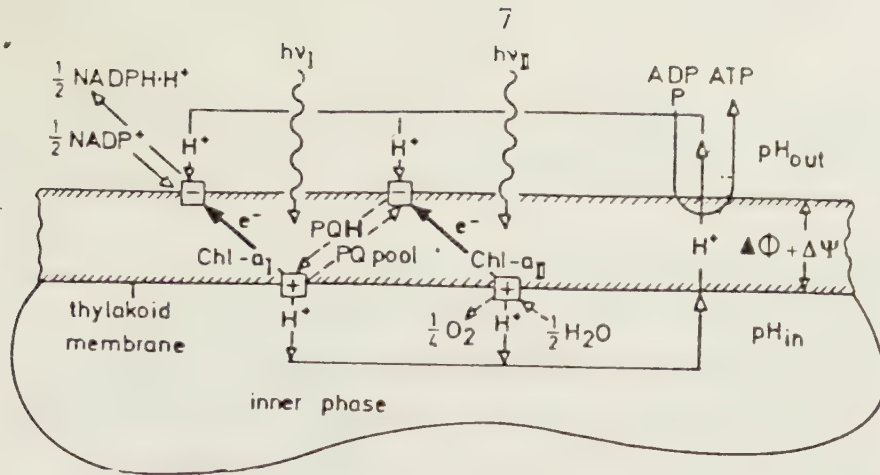


Abb. 1

Zick-Zack-Schema des vektoriiellen Transports von Elektronen und Protonen durch die photosynthetische Membran (Witt 1979)

Diese Thesen fassen zentrale experimentelle Resultate zusammen:

- 1) Vektorieller Transport von Protonen und anderen Ionen begleitet den Elektronentransport.
- 2) Es werden elektrochemische Potentialgradienten über energieleitenden Membranen gebildet.
- 3) Die Wirkung von Entkopplern besteht in der Möglichkeit, transmembrane Protonengradienten zu zerstreuen, da sie fast alle lipophile schwache Säuren sind.
- 4) Ein künstlich erzeugter elektrochemischer Protonengradient treibt ebenfalls die ATP-Synthese.

Im Licht dieser Theorie ist die Membran eine Diffusionsbarriere zwischen osmotischen Räumen und speichert selbst keine Energie. Das "Flüssige-Mosaik-Modell" von Singer und Nicolson beschreibt die Membran als Doppelschicht von Lipiden mit komplexen Phasenübergängen, in die Proteine eingelagert sind, oder sie durchsetzen. Elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, daß die Thylakoidmembranen Reihen von Partikeln enthalten; diese werden mit den Chlorophyll-Protein-Komplexen der beiden Photosysteme in Zusammenhang gebracht (Miller 1976).

Wesentlich spezifischere Informationen über die Orientierung der Komponenten des Elektronentransports kommen von Studien über die Zugänglichkeit der Kette für verschiedene Elektronendonoren und -akzeptoren und von Studien mit Antikörpern.

II) Die dynamische Struktur der Membran

Die Hypothese der Kopplung durch Konformationsänderungen wurde vor allem von P.D. Boyer vertreten:

Energiereiche Zwischenzustände zwischen Elektronentransport und Phosphorylierung sind konformationsvariable Polypeptidsysteme, die Energie direkt von den Redoxprozessen zur ATP-Synthese leiten. Ein analoger ATP-Umsetzungsprozess wäre in der ATP getriebenen Konformationsänderung des Myosins zu sehen. Da solche Energieumsetzungen reversibel sein sollen, wäre denkbar, daß das Zurückfalten einer energiereichen Proteinkonformation die ATP-Synthese antreibt.

Katchalsky und Zwick (1955), Kuhn et al. (1960) und Mandelkern (1967) beschreiben verschiedene Typen mechanochemischer Energieleitungssysteme. Biologische Membranen enthalten gewöhnlich eine große Anzahl von Polyelektrolyten; es ist daher denkbar, daß zentrale Membranfunktionen deren Eigenschaften als mechano-chemische Leiter benutzen. Die reversiblen Kontraktionseigenschaften von Polymeren werden beeinflußt durch Änderungen des chemischen Potentials, des Redoxpotentials und des pH-Wertes des umgebenden Mediums. Diese drei Faktoren sind auch eng verknüpft mit dem photosynthetischen Elektronentransport.

Unabhängig von dieser Hypothese, die bisher noch wenig gearbeitet wurde, lassen sich in Chloroplasten strukturelle Änderungen der Membrankonformation nachweisen.

Die Protonierungsreaktionen der Membran sind begleitet von Konformationsänderungen. Dies wurde durch Lichtstreuungsexperimente nachgewiesen (Dilley und Verum 1964, Hind und Jagendorf 1965, Dilley 1966, 1971, Murakami und Packer 1971), durch Volumenänderungen und durch elektronenmikroskopische Daten. Dearer et al. (1967) zeigte klar, daß ein Teil der Lichtstreuungsänderungen direkt bezogen ist zur Protonierung von Ladungen membrangebundener Gruppen, und nicht zu einfachen osmotischen Effekten. Dilley und Giaquinta (1974-76) wiesen in einer Reihe von Studien mit Hilfe chemischer Modifikation von Membranproteinen nach, daß mit Photosystem II assoziierte

Komponenten elektronentransportabhängige Konformationsänderungen ausführen.

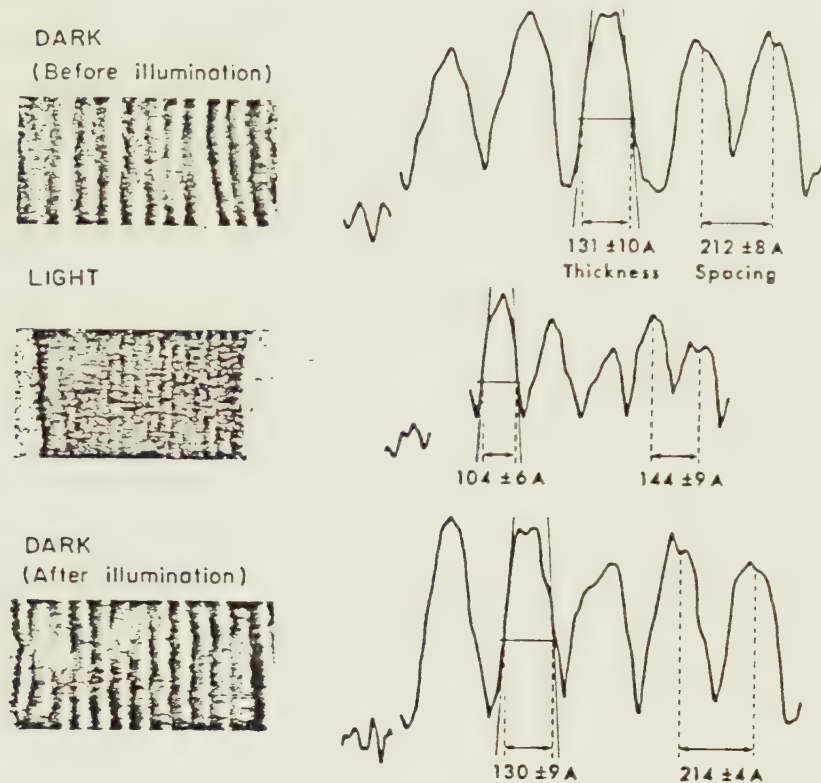


Abb. 2

Änderungen in Abmessung und Abstand der Thylakoidmembran in Granastapeln im Licht (Murakami und Packer 1971)

Chloroplasten oder Thylakoidmembranen weisen bei Belichtung makroskopische Konformationsänderungen auf, die mittels Lichtstreuung oder Elektronenmikroskop gemessen werden können. Konformationsänderungen von geringeren Dimensionen sind mittels chemischer Modifizierung von Membranproteinen studiert worden. Die Erfordernis von Licht für spezifische Inhibierungen mit chemischen Reagentien ist ein nützliches Mittel, funktionelle Konformationsänderungen zu studieren. Dabei sind zwei verschiedene Arten zu unterscheiden:

(R.P. Williams 1978)

- Konformationsänderungen der Membran oder des Protein-Konglomerats, d.h. Änderungen der Protein-Protein-Wechselwirkung in größeren Aggregaten.

Der Proteinanteil der Membran liegt über 50%.

Einige der Proteinaggregate sind sehr groß und haben einen Durchmesser bis zu 100 Å .

- Fluktuationen individueller Proteine; für Redoxreaktionen innerhalb der Elektronentransportkette sind sie wahrscheinlich begrenzt auf die Oberfläche der entsprechenden Komponente. Aber nicht nur lichtinduzierte Membranprotonierungsreaktionen rufen Strukturänderungen im Lipoprotein-Material der Membran hervor. Einige Kationen, besonders Mg^{++} und K^+ überqueren die Membran relativ leicht. Sie bewegen sich als Antwort auf den Protonengradienten; ihre endgültige Verteilung im Licht wird durch die Prinzipien bestimmt, die dem Donnan-Gleichgewicht zugrunde liegen. Photosystem II-Partikel und die lichtsammelnden Chlorophyll-Proteinkomplexe enthalten eine größere Zahl von Bindungsstellen, als von der Oberfläche intakter Membranen her erreichbar sind. Die Bindung von Kationen an diese verborgenen Stellen bewirken Wechselwirkungen zwischen dem Membranproteinen, die für die Integrität der Membran wichtig sind. Zusätzlich dazu gibt es Bindungsstellen für (vorzugsweise zweiwertige) Kationen an der Oberfläche der Membran , die über strukturelle Änderungen den Aufbau der Granastapel, den Anregungs-

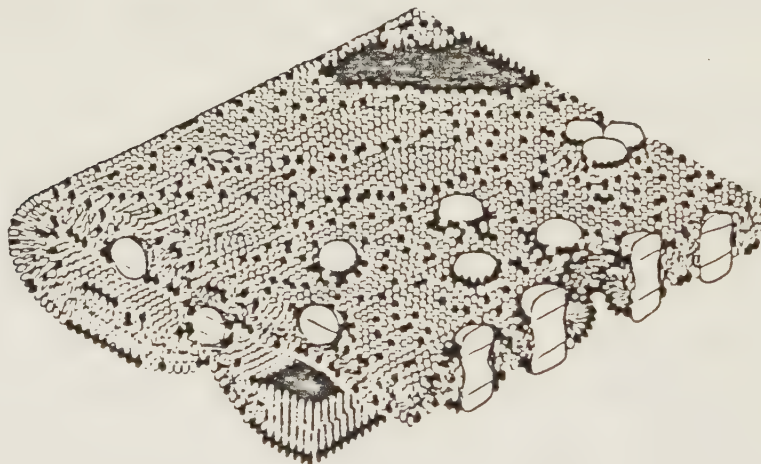


Abb. 3

Schematische Illustration einer biologischen Membran (aus zeichnerischen Gründen mit geringer Proteindichte) Die Proteine sind mit einer Domäne von Lipiden geordneter Struktur umgeben. Diese Domänen können als Diffusionsbarrieren wirken. (Deamer 1978)

energie-Transfer und den Protonentransport regulieren.
(Prochaska und Gross 1977)

Daher besteht auch ein direkter Zusammenhang zwischen den elektrogenen Ionenflüssen über die Membran und den Konformationsänderungen, die im Licht auftreten.

Konformationsänderungen in Thylakoidmembranen, die direkt als Antwort auf die Ladungstrennung in den Photosystemen entstehen, sind bisher nicht beschrieben worden. Derartige Prozesse sind an anderen Membranen aber schon beschrieben worden (Sackmann 1979).

Ob aber tatsächlich, wie von P.D. Boyer vermutet, diese Konformationsänderungen derart energiereiche Zustände darstellen, daß sie die ATP-Synthese vorantreiben, ist völlig offen. Sicher scheint zumindest, daß über Bindung und Freisetzung von Kationen (einschließlich Protonen) Konformationsänderungen der Thylakoidmembranen produziert werden, die ihrerseits die Photoreaktionen der Membran regulieren (Murakami und Packer 1975).

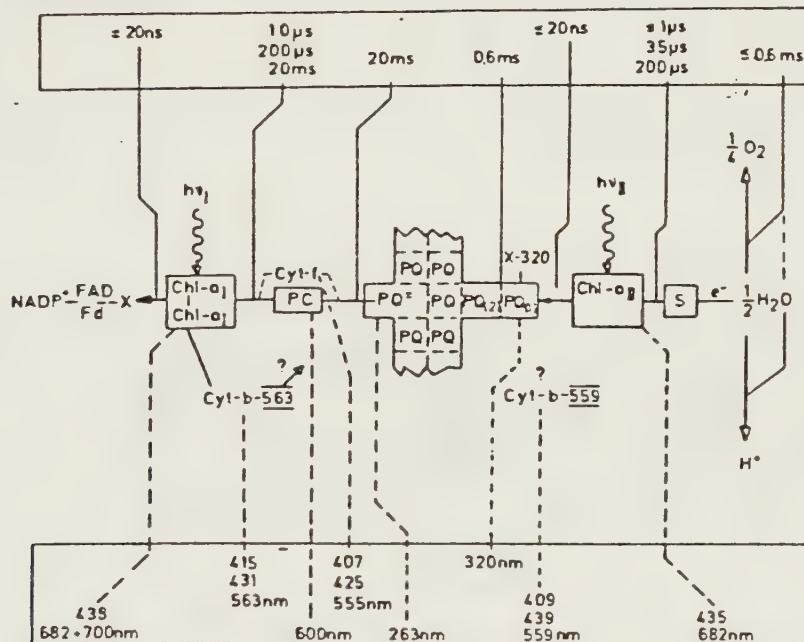


Abb. 4

Darstellung der wichtigsten Reaktionswege mit Elektronentransferzeiten und optischen Daten der Komponenten (Witt 1979)

Es gibt generelle Übereinstimmung, daß die Donorseite von Photosystem II in die innere Seite der Doppelmembran eingebettet ist, allerdings wurde schon vermutet, daß sie bei Belichtung exponiert wird.

Die Reaktionssequenz der Wasser-Spaltung scheint derart organisiert zu sein, daß Protonen in den Thylakoid-Innenraum freigesetzt werden.

Zugänglichkeitsstudien über PSII-Elektronenakzeptoren weisen nach, daß die reduzierende Seite, obwohl verdeckt in einer lipophilen Region, leicht zugänglich ist von der Außenseite der Membran.

Die physikalische Orientierung der Photosysteme und Komponenten des Elektronentransports, sowie das elektrische Feld über der Membran, hervorgerufen durch den Transfer eines Elektrons vom Reaktionszentrumschlorophyll zum primären Akzeptor, wurde von Witt (1979) untersucht.

Der Protonentransport über die Membran kommt zum Einen durch die wasserspaltende Reaktion von Photosystem II zustande, die Protonen auf der Innenseite freisetzt. Zum Anderen pumpt der Plastochinonspeicher zwischen den Photosystemen Protonen nach Innen.

Die Richtungen von Elektronen- und Protonentransport sind in den Abb.4 + 5 dargestellt.

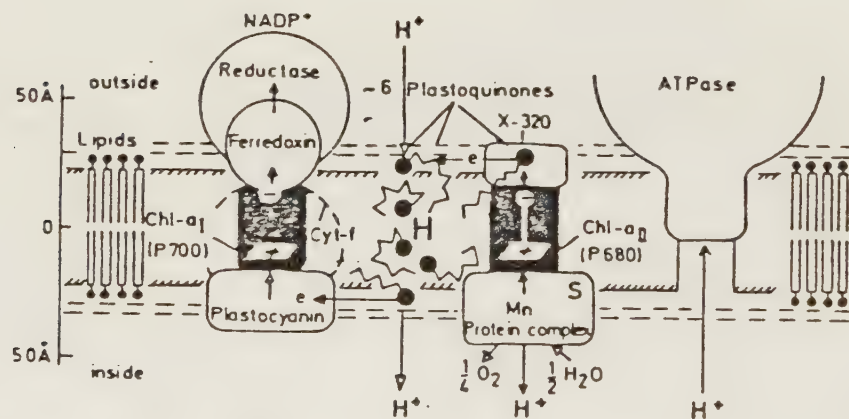


Abb. 5

Vorläufige Topographie der komplexen Vorgänge an der photosynthetischen Membran. Die beiden schwarzen Flächen symbolisieren die photoaktiven Zentren, die wahrscheinlich aus Chlorophyll-Protein-Komplexen bestehen. (Witt 1979)

Die Theorie von R.J.P. Williams (1976) stimmt in weiten Zügen mit der von Mitchell überein. Die Differenz liegt darin, daß Mitchell davon ausgeht, daß Protonen in das Stroma freigesetzt werden, während Williams annimmt, daß der effektive Protonengradient in der Membran selbst entsteht. In beiden Fällen ist aber der Protonengradient das energiereiche Zwischenstadium von Elektronentransport und Phosphorylierung.

P.D. Boyer (1973) nahm ein weiteres Zwischenstadium an: eine Konformationsänderung im Kopplungsfaktor, die die Affinität der Bindungsstellen für ADP und Phosphat ändert. Diese Ansätze von Williams und Boyer werden experimentell und theoretisch weit weniger verfolgt als die Mitchell'sche Theorie.

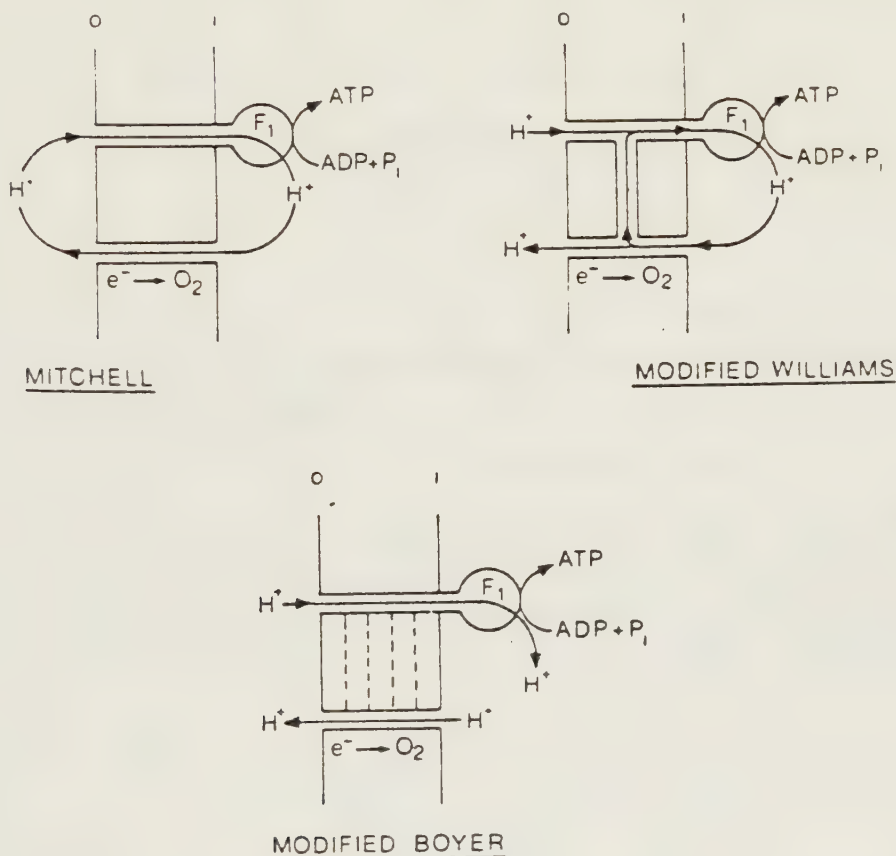


Abb. 6

Drei Hypothesen, die die Kopplung zwischen Phosphorylierung und Protonentransport beschreiben (Slater 1977)

III) Photosystem II und das Sauerstoff entwickelnde System

A) Das Sauerstoff entwickelnde System

Abb. 7 stellt das allgemein akzeptierte kinetische Modell der Sauerstoffentwicklung dar (Kok et al. 1970). Nach diesem Schema führt jedes der Enzymsysteme zyklische Reaktionen aus. Zu jedem Enzymsystem gehört ein photoaktives Photosystem II-Zentrum. Jeder der vier photoaktiven Schritte enthält einen 1-Quanten-Prozeß: das Äquivalent einer positiven Ladung wird jeweils gespeichert, bis der Zustand S_4 erreicht ist, in dem vier Ladungen akkumuliert sind. Dieser Reaktion folgt die (Dunkel-) Reaktion, bei der Sauerstoff freigesetzt wird.

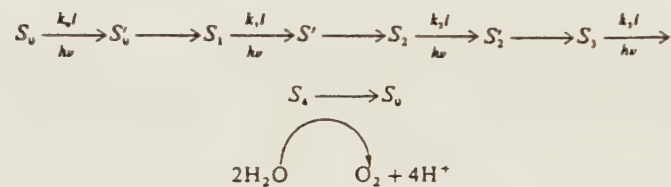


Abb. 7

Schematisches Diagramm der Sauerstoffentwicklung, vorgeschlagen von Kok et al. (1970). Die Indizes ($n=0-4$) bezeichnen die Oxidationszustände des Sauerstoff entwickelnden Systems. Die Schritte $S_n \longrightarrow S_n$ stellen Photoübergänge dar (ausgezogene Pfeile), die Schritte $S_n \longrightarrow S_{n+1}$ repräsentieren Reaktivierungsreaktionen. Sauerstoff wird während des Übergangs $S_4 \longrightarrow S_0$ entwickelt.

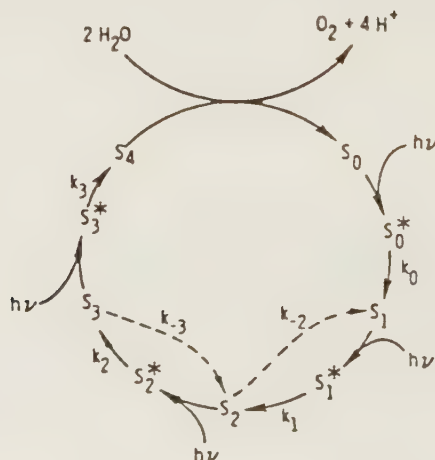


Abb. 8 zeigt eine Messung der Sauerstoffentwicklung nach kurzen Lichtblitzen. Sie zeigt eine gedämpfte Oszillation der Erträge mit der Periode 4. Dieses experimentelle Resultat ist die Grundlage für das Kok'sche Modell.

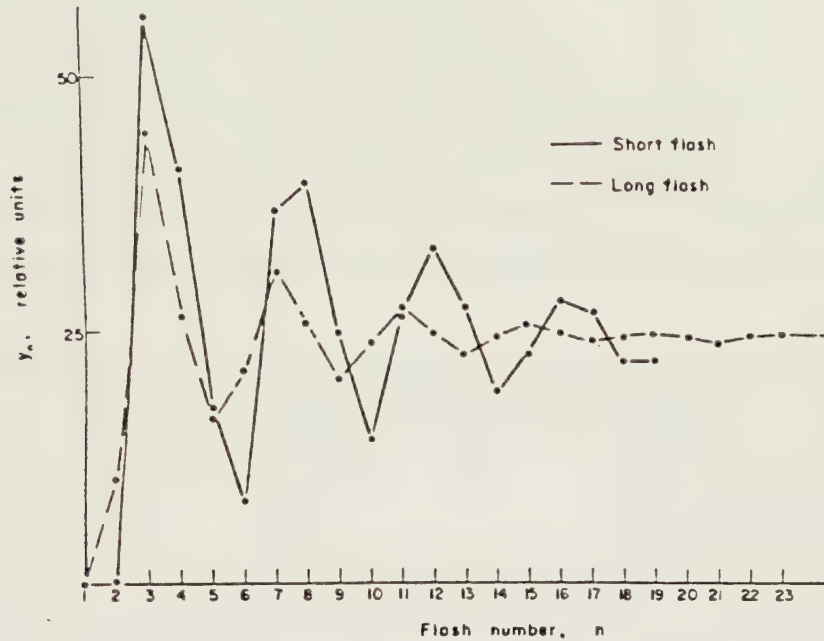


Abb. 8

Sequenz der Sauerstoffausbeute von Spinachchloroplasten nach kurzen und langen Lichtblitzen ($2 \mu\text{s}$ bzw. $10 \mu\text{s}$ Dauer). (Joliot et al. 1971)

Über die chemische Natur der S-Zustände und den Mechanismus der Reaktion, bei der Wasser oxidiert wird, ist so gut wie nichts bekannt, außer daß gebundene Mangan-Ionen in diesem Prozeß eine Rolle spielen. Daher sind in der Hauptsache Informationen über die Kinetiken der S-Zustände sowie über die hypothetische Beteiligung höherer Redoxzustände von Mn in der Literatur zu finden.

Die Verbindung des photoaktiven Zentrums von Photosystem II und dem Sauerstoff entwickelnden System ist sehr labil und die empfindlichste Stelle der Elektronentransportkette. Auf der Basis selektiver Inhibierung der Oxidation künstlicher Donoren bei Verwendung verschiedener Inhibitoren wurden unterschiedliche Stellen charakterisiert. Diese

Resultate sind aber, wie Trebst (1974) betont, eventuell kein Hinweis auf unterschiedliche Komponenten, sondern Ergebnis unterschiedlicher Zerstörungsgrade von Photosystem II durch die verschiedenen Behandlungen. Zwischen dem Sauerstoff entwickelnden System und der Lumineszenz besteht offensichtlich ein Zusammenhang. Nach Blitzbeleuchtung wurden ein Oszillations-Schema der Lumineszenz beobachtet, das dem der Sauerstoffentwicklung ähnelt. Zankel maß es für Komponenten nach ca. 35 μ sec und 200 μ sec; nach ca. 5 msec tritt eine 'Phasenverschiebung' auf; das Maximum liegt dann beim zweiten Blitz. (Abb. 9)

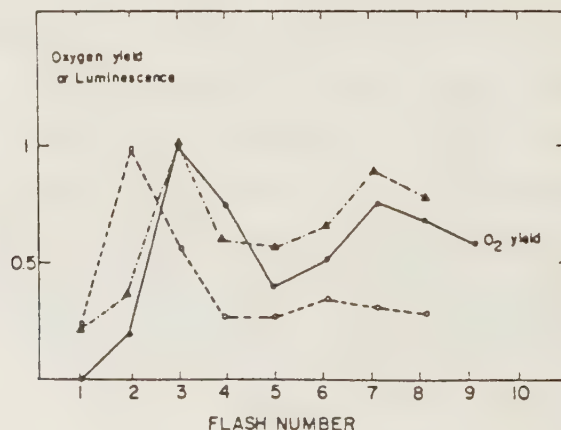
Ob eine direkte Beteiligung der S-Zustände an der Reaktion besteht, die Lumineszenz erzeugt, oder ob eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen einer gespeicherten Ladung und dem Donor von Photosystem II besteht, ist offen. Hier gilt aber auf jeden Fall, daß die Lumineszenz nach unterschiedlichen Zeiten verschiedenen Einflüssen unterliegt. Hier liegt besonders für Zeiten im Millisekundenbereich eine Fülle von Literatur vor. Einer der wesentlichen modulierenden Faktoren ist der Zustand der Thylakoidmembran selbst, insbesondere das elektrochemische Potential.

Abb. 9

Oszillationen der Lumineszenzintensität verglichen mit Oszillationen der Sauerstoffentwicklung nach Blitzfolgen

- Sauerstoffertrag ▲ Lumineszenz nach 240msec
- Lumineszenz nach 30 μ sec

(S.Malkin 1977)



B) Der Aufbau des elektrochemischen Potentialgradienten durch Photosystem II

Im kontinuierlichen Licht entsteht zunächst am Photosystem II durch eine Ladungstrennung ein relativ großer elektrischer Potentialgradient, ca. 200 mV, der dann auf einen stationären Wert in der Größenordnung von ca. 10 mV abfällt.

Jursinic und Gowindjee (1978) nehmen an, daß die Ladungstrennung im Reaktionszentrum von Photosystem II die Ladungen nicht über die ganze Dicke der Membran separiert, sondern nur um einige 10 Å. (Abb. 10)

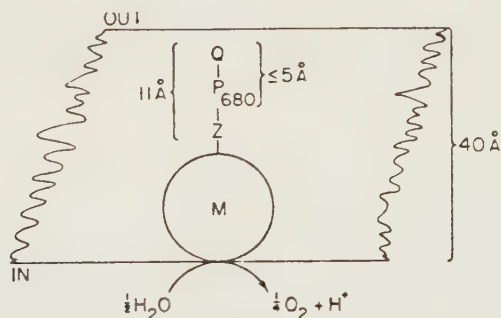


Abb. 10

Arbeitsmodell für die mögliche Anordnung der Photosystem II-Komponenten. M bezeichnet das Sauerstoff entwickelnde System (Jursinic et al. 1978)

Die Geschwindigkeit des Abfalls des Feldes ist begrenzt durch den Protonentransport durch die Membran und durch passive Ionenflüsse.

Dieser Ionentransport ist durch den elektrischen Potentialgradienten bedingt, und wird nicht durch ionenspezifische Enzymtransportsysteme verursacht.

Während der Aufbau des elektrischen Potentialgradienten in weniger als 20 nsec erfolgt, braucht sein Abbau mehrere hundert msec. Durch beschleunigten Fluß von positiv geladenen Ionen, z.B. in der Gegenwart von Valinomycin + K^+ oder Gramicidin D, wird das lokale Feld erheblich schneller kompensiert.

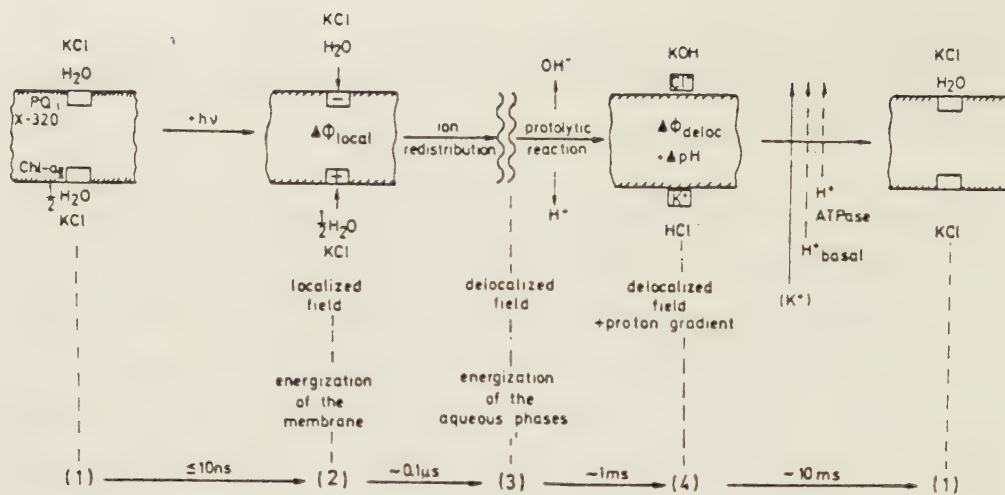


Abb. 11

Entwicklung der verschiedenen Phasen des energiereichen Zustands der Thylakoidmembran im Bereich von Photosystem II (Witt 1979)

Die Protonenaufnahme im Licht senkt den pH-Wert im Innern um maximal drei pH-Einheiten und neutralisiert negative Ladungen auf der Innenseite der Membran. Dabei werden Mg (II) und andere Kationen freigesetzt, die bei hohem pH-Wert im Dunkeln Komplexe mit negativ geladenen Gruppen bilden. Die Bindung von Protonen an die innere Membranseite bewirkt eine Zunahme des Potentials der inneren Oberfläche. Unter Gleichgewichtsbedingungen beschränkt sich die Potentialdifferenz über die Membran auf die Potentialdifferenz der Oberflächen. Der Beitrag der flüssigen Phasen, die an die Membran angrenzen, ist dagegen gering.

Abb. 12 zeigt den Zusammenhang von elektrischem Potential, Oberflächenpotential und dem pH-Gradienten.

Der Zusammenhang zwischen der Lumineszenz und dem elektrochemischen Potentialgradienten besteht darin, daß dieser die Aktivierungsbarriere für die Rekombination erniedrigt. Daher wirkt sich jeder Einfluß auf das Membranpotential auch auf die Intensität der Lumineszenz aus, bzw. die Messung der Lumineszenz unter verschiedenen Bedingungen erlaubt Rückschlüsse auf das Membranpotential.

Im μsec -Bereich ist allerdings nach Jursinic et al. (1978) die Lumineszenzintensität und -abklingkinetik unabhängig vom Membranpotential.

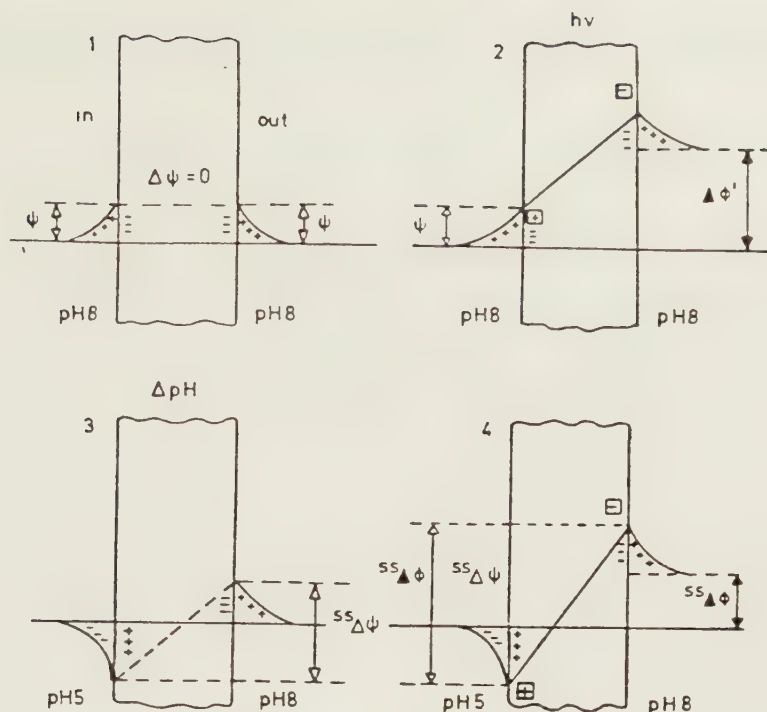


Abb. 12

Das Ausmaß des elektrischen Potentials, $\Delta\psi$ (hervorgerufen durch Ladungstrennung) und des Oberflächenpotentials $\Delta\phi$ (hervorgerufen durch Protonierung) über die Thylakoidmembran nach Beginn einer kontinuierlichen Beleuchtung (Witt 1979)

Da die Reoxidation von Q^- eine Halbwertszeit von 0,5 msec hat, und ihre Inhibierung durch DCMU die 200 μ sec-Komponente der Fluoreszenz unterdrückt, scheint die schnelle Abklingphase der Lumineszenz die Reduktion von P_{680}^+ zu repräsentieren. Dies wurde auch durch den Vergleich des Oszillationsschemas der P_{680}^+ - Reduktion und der Lumineszenzintensität in diesem Zeitbereich festgestellt. (Gläser et al. 1976). Die Gründe der Unabhängigkeit dieser Komponente der Lumineszenz vom Membranpotential sind aber noch nicht klar.

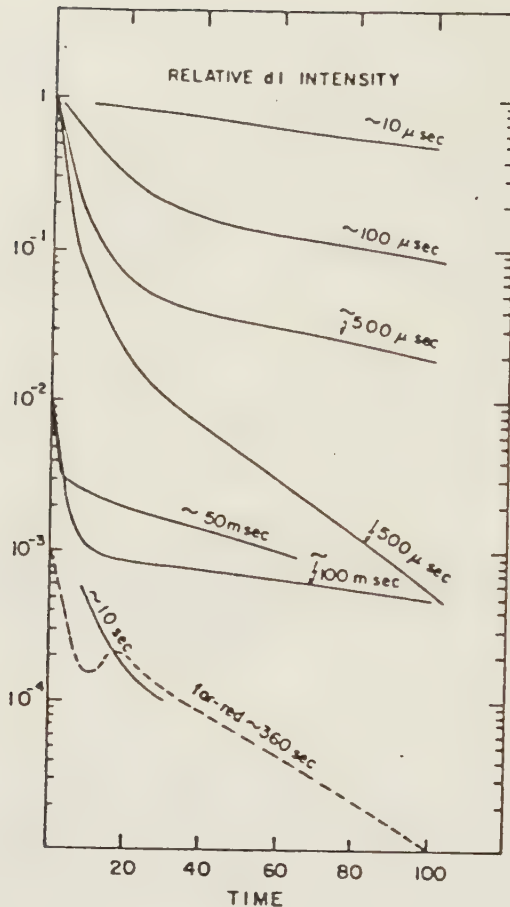


Abb. 13

Darstellung des Abfalls der Lumineszenz photosynthetischer Systeme in verschiedenen Zeitbereichen. Die Zeitskala ist willkürlich; die Zeit, die an jeder Kurve notiert ist, repräsentiert die Hundert der Zeitskala unten. ~ bezeichnet kontinuierliche Vorbeleuchtung, ⚡ repräsentiert Blitzanregung in steter Folge, ⚡ repräsentiert Anregung durch einzelne Blitze. Der Vergleich der Kurven ist nicht exakt, gibt aber Richtwerte an.

(S.Malkin 1977)

IV) Die hemmende Wirkung von Cu(II) auf die Photosynthese

Nur wenige Arbeiten sind bisher über die Cu(II)-Inhibierung der Photosynthese veröffentlicht worden.

Mac Dowall (1949) fand, daß die Inhibierung einer von Chloroplasten ausgeführten Hill-Reaktion durch Cu(II) abhängig ist von der Bestrahlungsintensität, und folgerte, daß eine Lichtreaktion der Photosynthese angegriffen wird. Steemann und Nielsen (1970, 1971) stellten bei Chlorella die Hemmung von Licht- und Dunkelreaktionen fest.

Während Gross et al. (1970) als Angriffsort die Pigmente der Chloroplasten annahmen, fand Habermann (1968), daß Cu(II) an der Stelle der Mn-Photooxidation in Photosystem II wirkt.

Sie stellte die Hypothese auf, daß Mn(II) und Cu(II) um dieselbe Bindungsstelle an einem Enzym konkurrieren. Cedeno-Maldonado et al. (1972) stellten fest, daß der Wirkungsort von Cu(II) auf der oxidierenden Seite von Photosystem II liegt. Sie nahmen an, daß Cu(II) mit Sulfhydrylgruppen eines Enzyms reagiert. In weiteren Studien wurde vermutet (Vierke und Struckmeier 1977, 1978), daß die Bildung eines Cu(II)-Komplexes mit einem Membranprotein für die Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung verantwortlich ist.

Die bisher veröffentlichten Arbeiten geben ein sehr unvollständiges und teilweise widersprüchliches Bild der Wirkung von Cu(II). Im Besonderen ist ungeklärt, warum Licht für den Prozeß der Inhibierung notwendig ist.

Experimentelle Methoden

I) Chloroplastenpräparation

Class (II) -Chloroplasten wurden aus im Handel erhältlichen Spinatblättern nach der Methode von Sane et al. (1970) isoliert. Osmotisch geschockte Chloroplasten wurden nach Lilley et al. (1975) präpariert. Der Inkubationspuffer enthielt 50 mM/L TES-NaOH-Puffer pH 7,9 , 5mM/L MgCl_2 , 0,2 M/L Saccharose. Dieser Puffer hat den Vorteil, daß er Cu(II) mit einem pK_M von 3,2 komplexiert und so die Bildung von Cu(OH)_2 verhindert. Im ESR-Spektrum wurde kein Signal von Cu(OH)_2 gefunden. Der Chlorophyllgehalt wurde nach Arnon (1949) bestimmt. Thylakoiden wurden durch 2-minütige Ultraschall-Fragmentierung der Chloroplasten gewonnen. Dazu wurde das Ultraschallgerät TIG 250 der Firma Scheller (250 W, 40 kHz) benutzt. Silicomolybdat wurde nach Strickland (1952) synthetisiert und die Reduktion durch den photosynthetischen Elektronentransport mit Hilfe des ESR-Spektrums von Heteropolyblau nachgewiesen. (Abb. 15) Zur Bestimmung der Reduktionsgeschwindigkeiten wurde ein Cary-15 Absorptionsspektrometer benutzt (Abb. 22). Ein millimolarer Extinktionskoeffizient von 8 mM^{-1} wurde verwendet. Abb. (14- 16) zeigen ESR-Spektren und das optische Spektrum von reduziertem Silicomolybdat. Die ESR-Spektren wurden mit einem Varian ESR-Spektrometer E 12 mit X-Band-Mikrowellenbrücke E 101 aufgenommen. Die Varian-Multipurpose-Cavity E 231 wurde verwendet und die Temperatur der Proben mit dem Varian E 257-10-Gerät konstant gehalten. Zur Kühlung wurde verdampfender Stickstoff verwendet. Die Magnetfeldmessungen wurden mit einem Protonenresonanzgerät durchgeführt, dessen Frequenz mit einem Racal-Frequenzzähler bestimmt wurde. Die Mikrowellenfrequenz wurde mit einem Systron + Donner- Zähler 1037 und einem Transfer-Oszillator 1292 bestimmt.

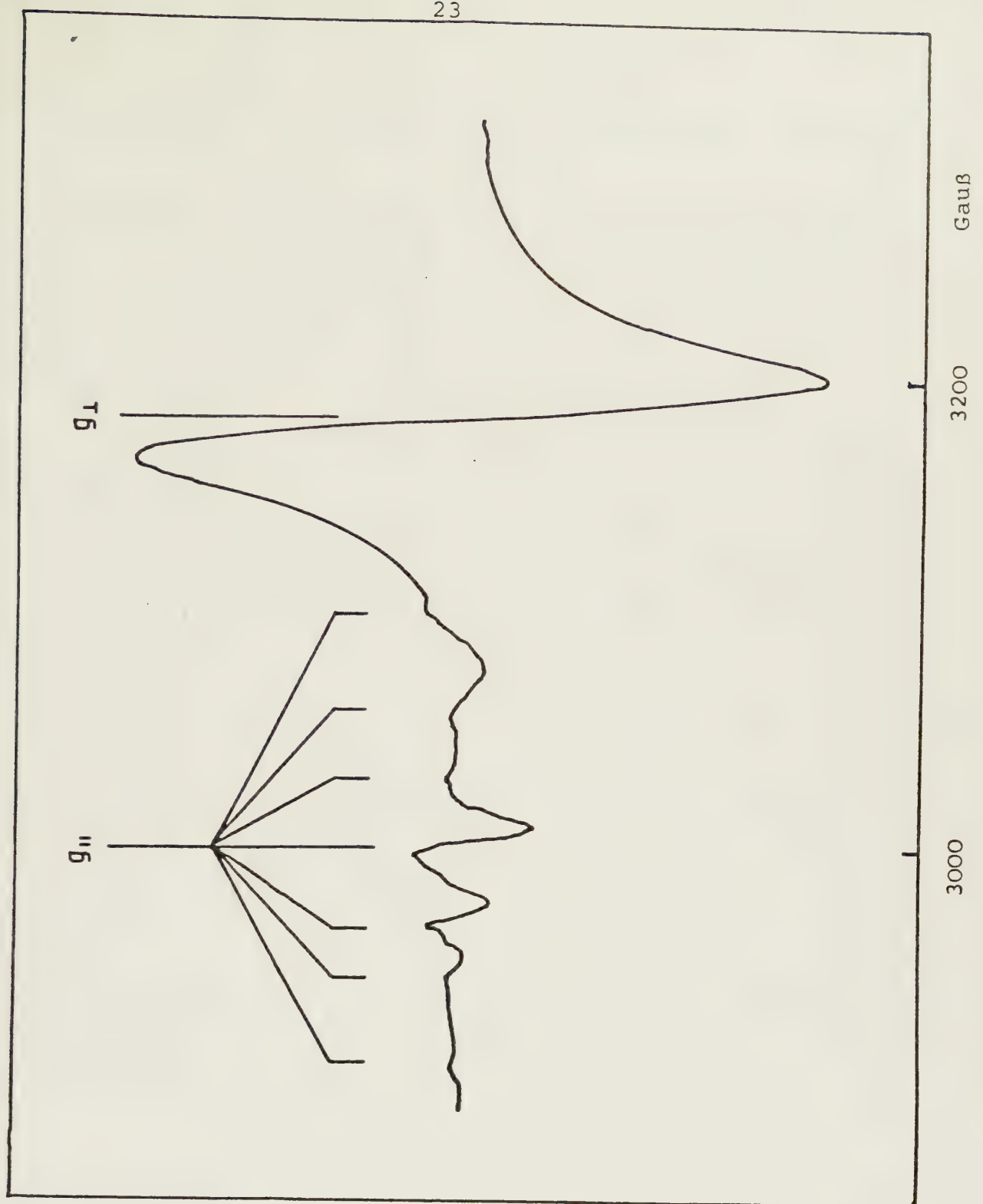


Abb. 14

ESR-Spectrum von Silicomolybdat, reduziert durch einige Kristalle Natriumascorbat (Heteropolyblau)

Verstärkung $2.5 \cdot 10^{-3}$, Leistung 50 mW, Zeitkonstante 1,0 sec, Modulationsamplitude 2,0 Gauß, Klystronfrequenz 9,26 GHz, Scan-Zeit 8 min, Temperatur 90°K , 3,4 mg Simo/ml.

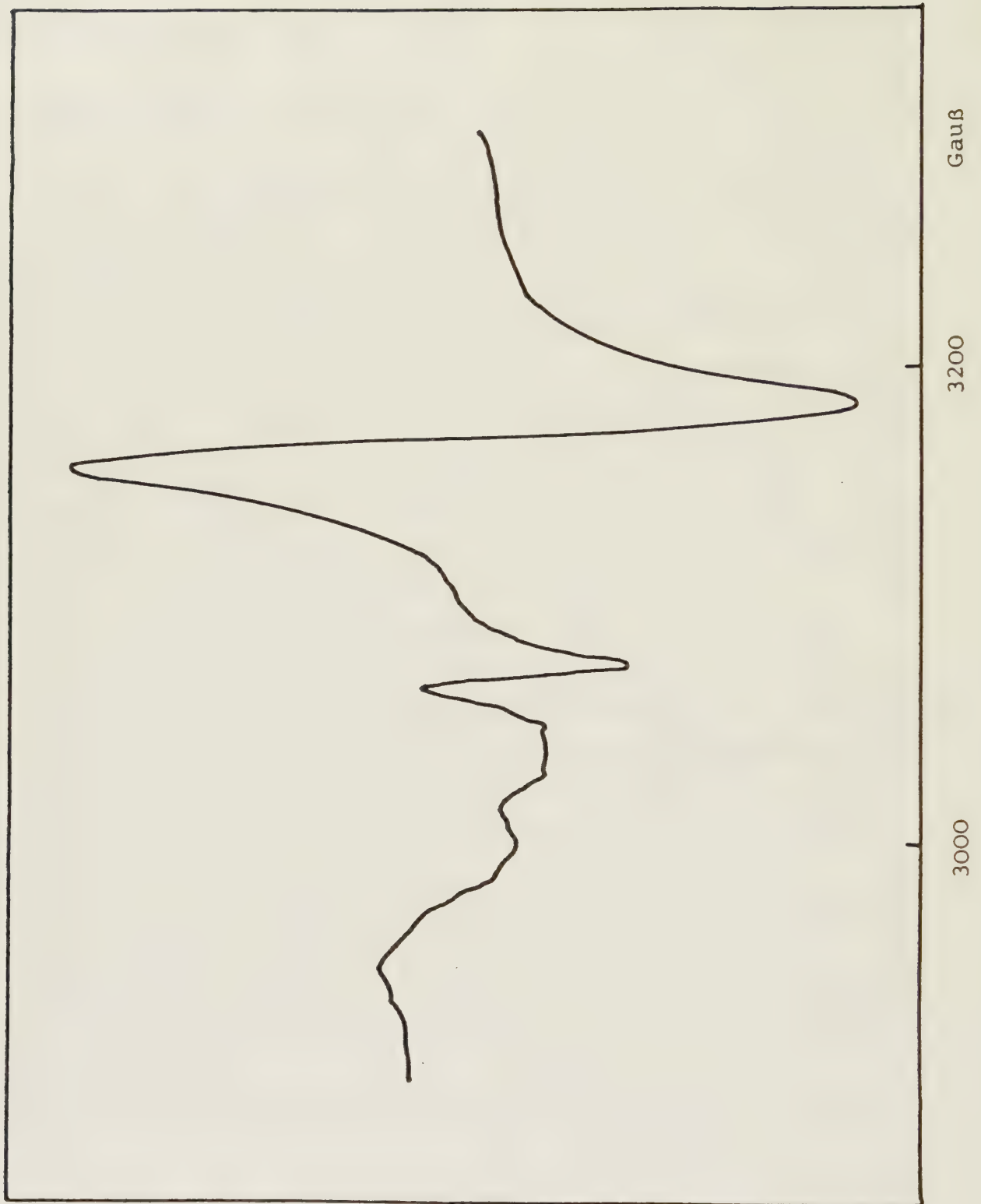


Abb. 15

ESR-Spektrum von photoreduziertem Silicomolybdat (Heteropolyblau)
 Verstärkung $4 \cdot 10^{-2}$, Leistung 50 mW, Zeitkonstante 0,1 sec,
 Modulationsamplitude 10 Gauß, Klystronfrequenz 9,26 GHz, Scan-
 zeit 4 min; 90°K ; 200 $\mu\text{M/L}$ Simo, 50 μg Chl/ml

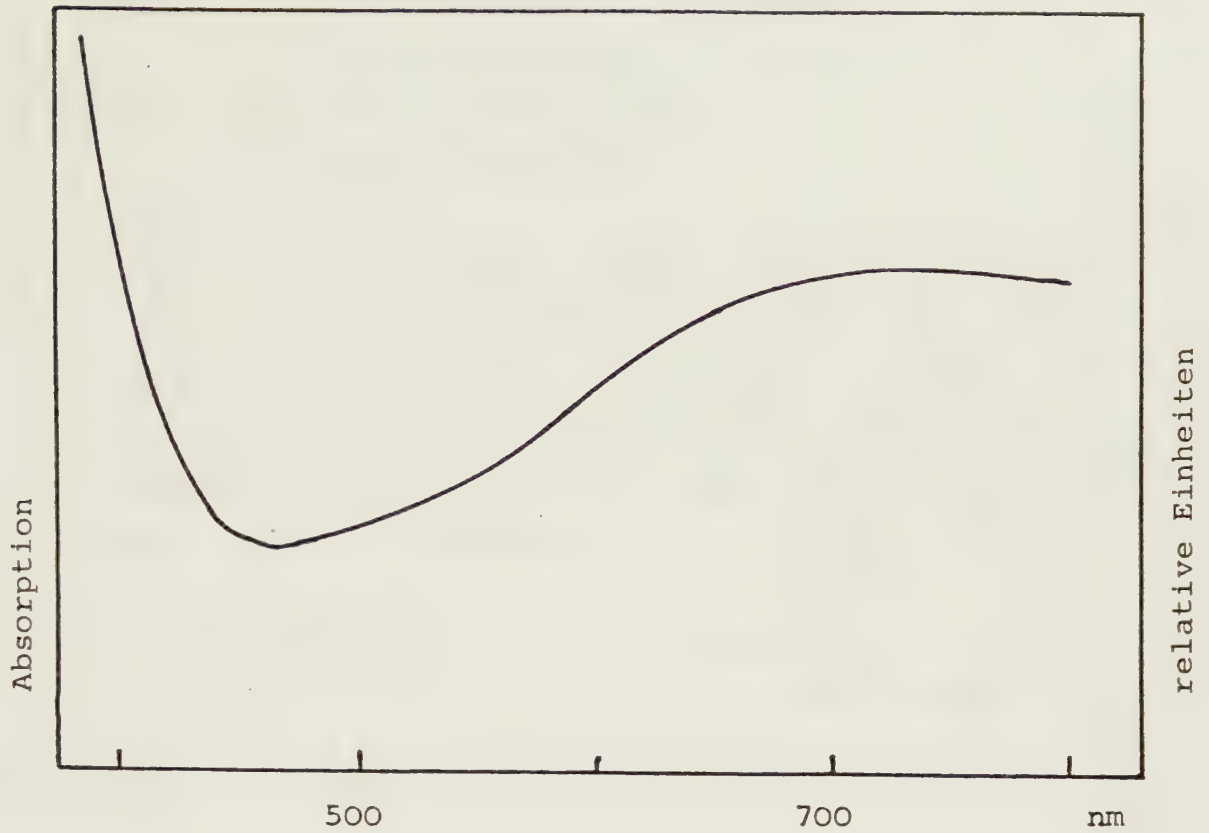


Abb. 16

Optische Absorption von Silicomolybdat, reduziert durch einige Kristalle Natriumascorbat (Heteropolyblau)

0.5 mg/ml Simo in Tridest

II) Messung der O_2 -Aktivität

Zur Messung der Sauerstoffaufnahme oder -abgabe von Chloroplasten wurde eine Apparatur konstruiert. Abb.

Zur Bestrahlung wurde eine Halogenlampe Sylvania DXX 800 W mit einem $CuSO_4$ -Wasserfilter von 10 cm Länge, die IR-Reflexionsfilter Schott IR 115 und IR 116, sowie Schott GG475 verwendet. Wurde mit DIL-Interferenzfiltern bestrahlt, so wurden die IR-Reflexionsfilter weggelassen.

Die Lichtintensität wurde über die Spannung gesteuert.

Entwicklung oder Verbrauch von Sauerstoff wurden in einem wassergekühlten Reaktionsgefäß der Firma Hansatech mit einer Elektrode vom Clark-Typ gemessen. 1 ml der Chloroplastensuspension wurde darin mit einem Magnetrührer in der Schwebe gehalten.

Mit Hilfe eines Thermostaten F 4291 der Firma Haake wurde die Temperatur der Meßlösung eingestellt und mit einem Eisen-Konstantan-Thermoelement direkt in der Lösung kontrolliert. Dazu wurde ein Millivoltmeter TE 923 der Firma Tekelec Airtronic verwendet.

Zur Aufzeichnung der Meßwerte wurde eine Potentiometereinheit mit Nullpunktunterdrückung der Firma Hansatech und ein X-T-Schreiber Servogor S von Metrawatt benutzt.

Mit einer rotierenden Sektorscheibe konnte die Beleuchtung periodisch unterbrochen werden. Dazu wurde ein PAR-Rotor Modell 192 mit der dazugehörenden Steuereinheit verwendet. Die Apparatur wurde mit luftgesättigtem Wasser (100⁰/o -Linie) und einigen Kristallen Natriumdithienit (Null-Linie) geeicht. Die Lichtintensität auf der Oberfläche der Meßküvette wurde mit einer Thermosäule CA1 von Kipp und Zonen gemessen. Sie betrug maximal 120 mW/cm².

Die Abb. (17 - 21) zeigen ein Schema der Meßanordnung und die charakteristischen Daten der Anlage.

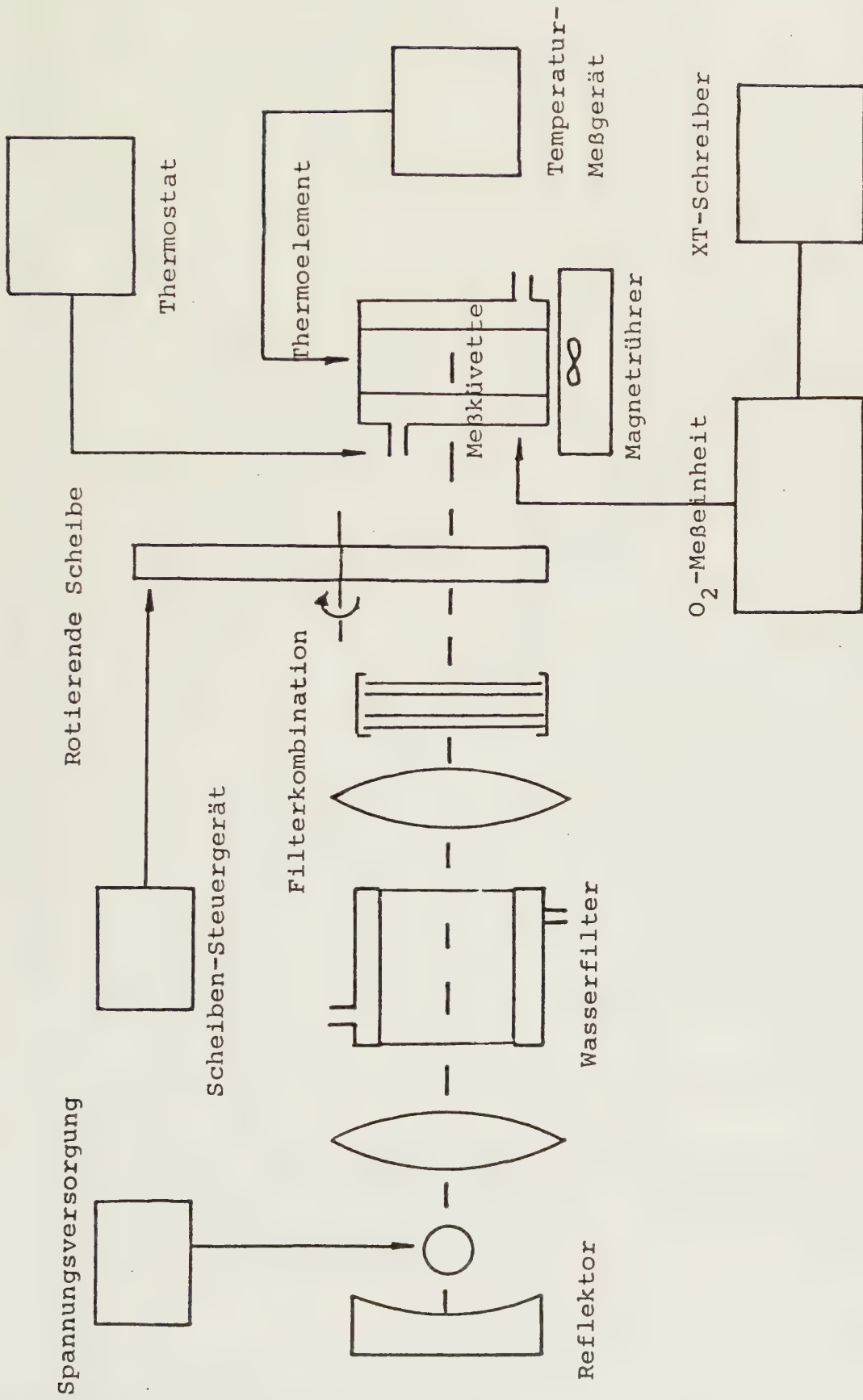


Abb. 17

Schema der zur Messung der Sauerstoffentwicklung verwendeten Anlage

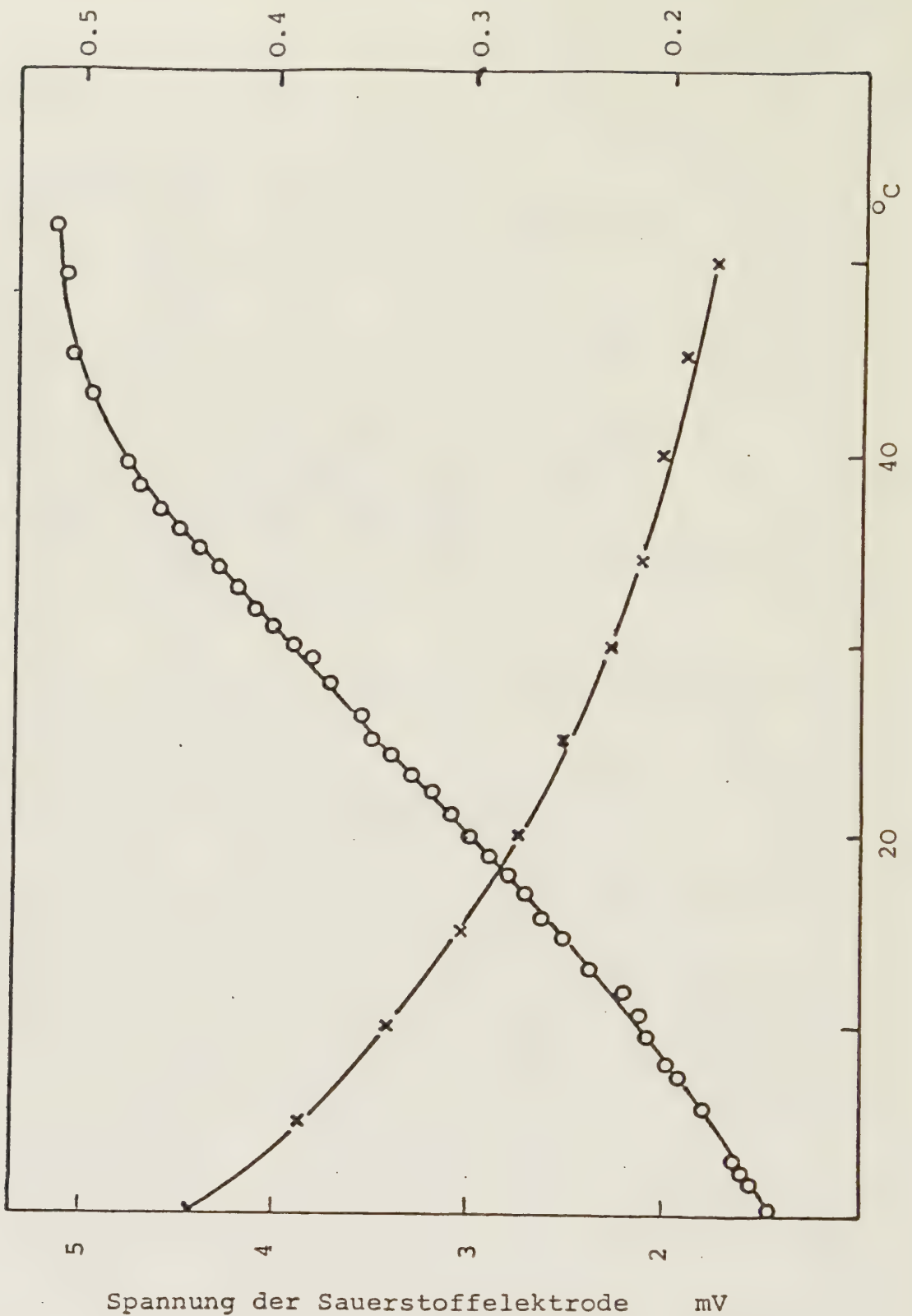
Sauerstoffkonzentration $\mu\text{M/L}$ 

Abb. 18

Spannung der Sauerstoffelektrode mV

Temperaturempfindlichkeit der Sauerstoffelektrode

○ ○ ○ Spannung der Sauerstoffelektrode

x x x Sauerstoffkonzentration in Wasser

Die Spannung der Sauerstoffelektrode wurde in luftgesättigtem Wasser gemessen, die Werte der Sauerstoffkonzentration in Wasser sind Literaturwerte

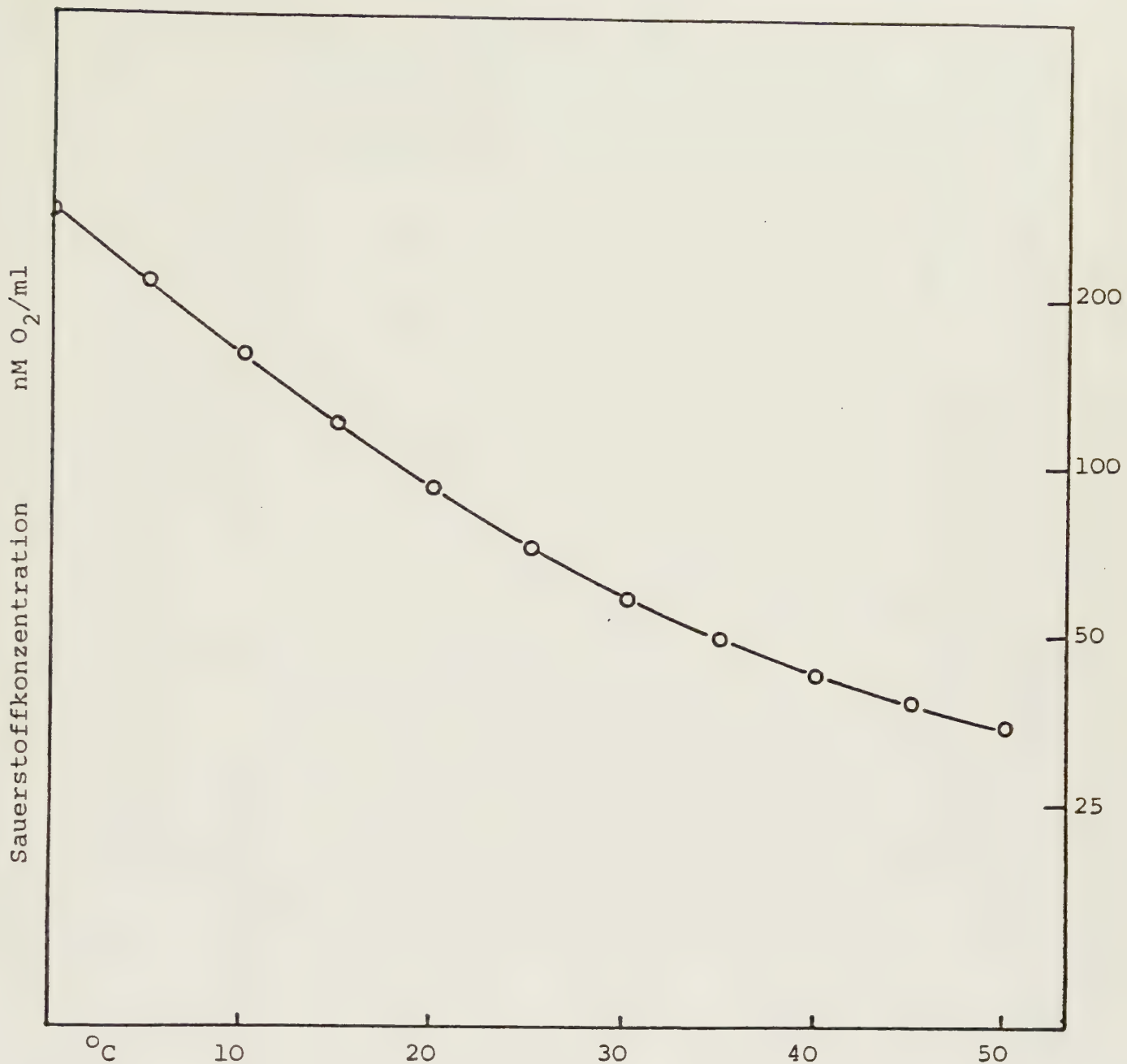


Abb. 19

Temperatureichung der Sauerstoffelektrode
angegeben ist die Konzentration an Sauerstoff, die einer
Spannungsänderung von 1 mV entspricht. Die Eichkurve wurde aus
den Daten von Abb. 18 bestimmt.

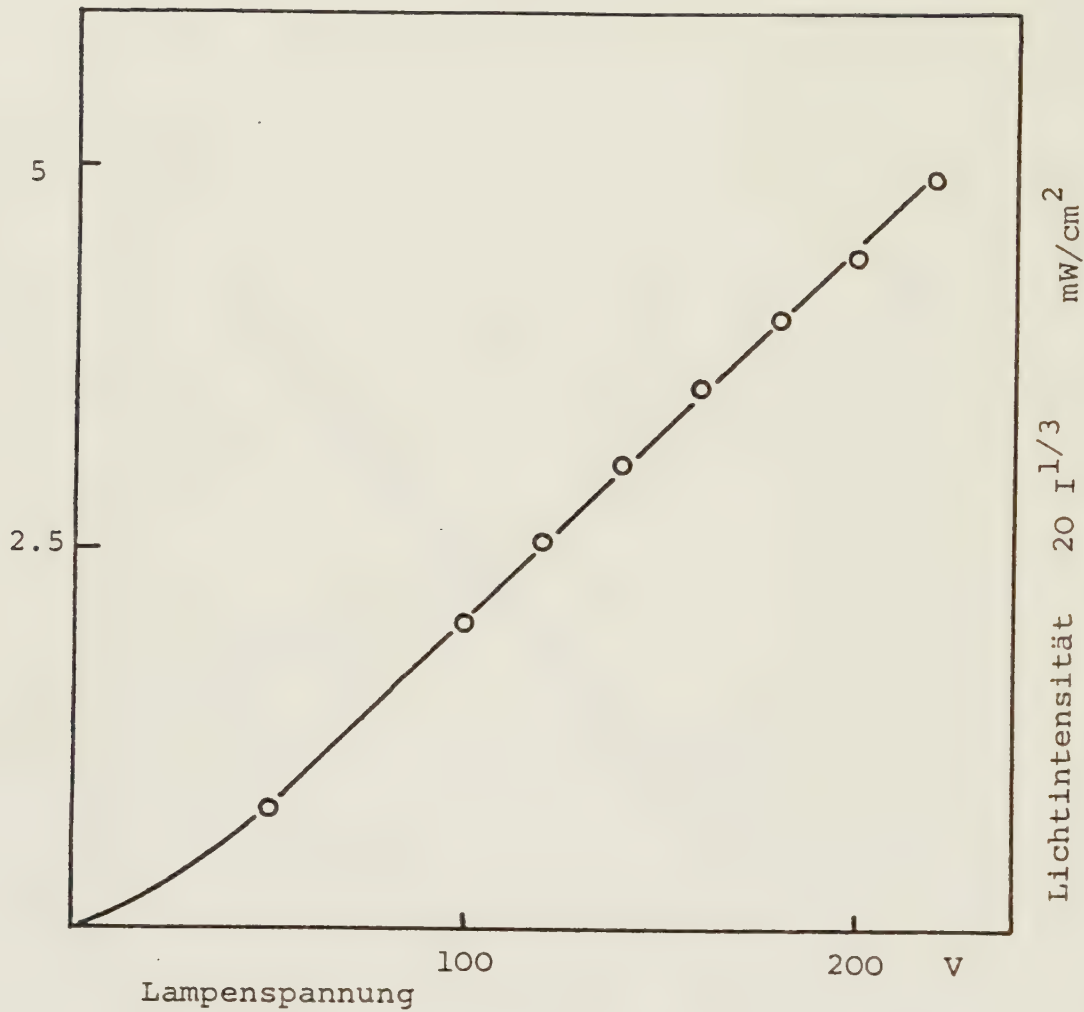


Abb. 20

Lichtintensitätscharakteristik der Bestrahlungsanlage der Apparatur zur Messung der Sauerstoffkonzentration

Das Licht wurde durch 8 cm CuSO_4 -Lösung, die Infrarotreflexfilter Schott IR 115 + 116, sowie ein Schott Kantenfilter GG 475 gefiltert. Die Lichtintensität wurde mit einer Thermosäule gemessen. Sie entspricht der auf der Oberfläche der Sauerstoffküvette.

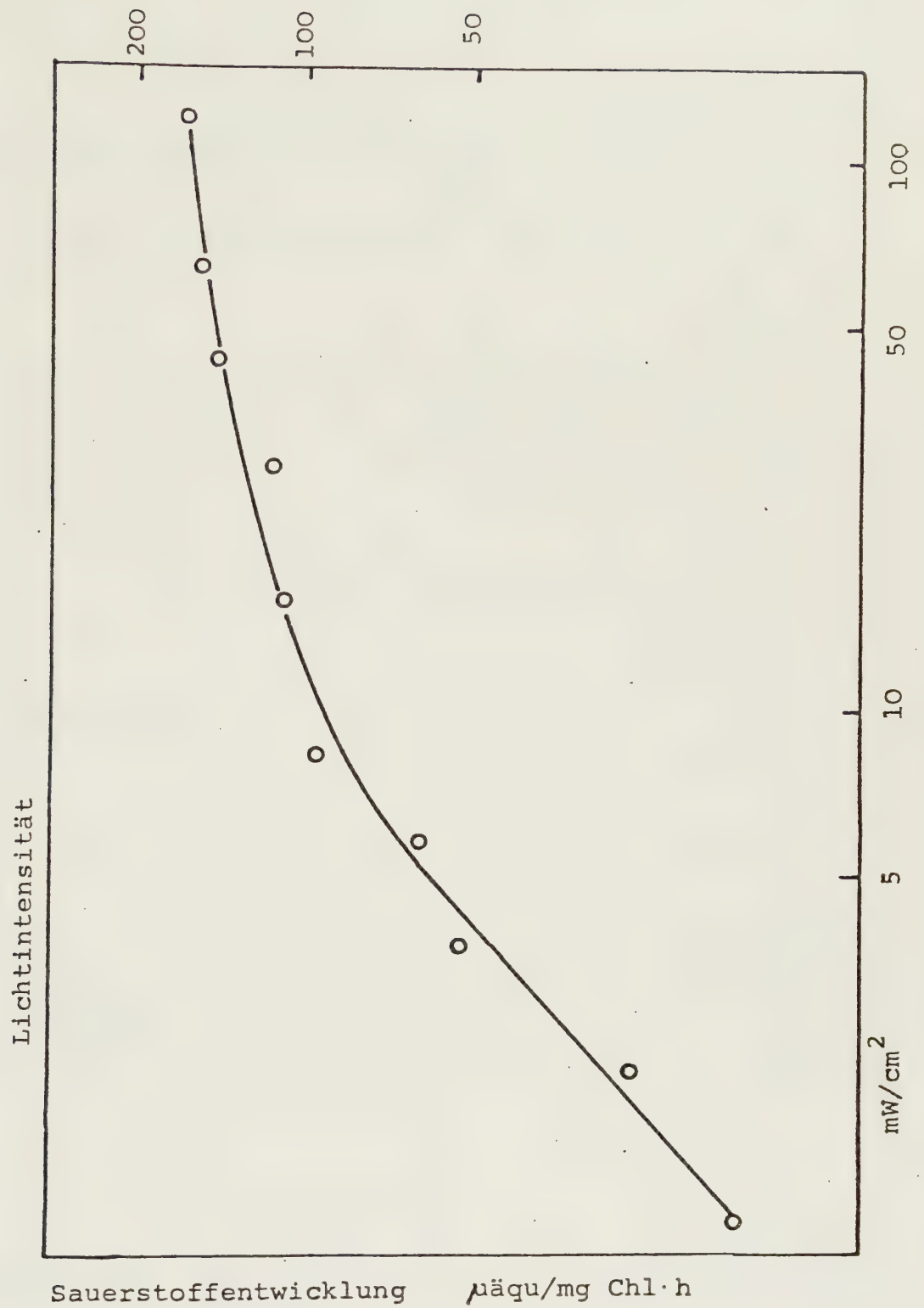


Abb. 21

Sättigungscharakteristik der photosynthetischen Sauerstoffentwicklung

Als Akzeptor wurde $200 \mu\text{M/L}$ Simo in der Gegenwart von $4 \mu\text{M/L}$ DCMU benutzt.

III) Colorimetrische Bestimmung von Cu

Als Reagenz auf Cu(I) wurde Neocuproin benutzt.

Folgende Verfahren wurden angewendet:

- 1) 3 ml Chloroplastensuspension wurden dunkel-oder licht-adaptiert (50 μg Chl/ml)
- 2) CuSO_4 im Puffer gelöst wurde zugegeben und nach entsprechender Zeit durch ein Sartorius Membranfilter SM 11107, Porengröße 0,2 μm , gefiltert.
- 3) Der Referenzwert der Absorption bei 455 nm wurde vor der Zugabe von 50 μl Reagenzlösung bestimmt. Als Reagenzlösung diente 100 mg Neocuproin in 5 ml Äthanol.
- 4) Nach 30 min wurde die Absorption bei 455 nm gemessen.

Zur Bestimmung der Cu (II)-Konzentration wurde Cu(II) mit einigen Kristallen Natriumascorbat reduziert.

Die Cu-Konzentrationen der Chloroplastensuspensionen ohne künstliche Zugabe schwankten zwischen $6 - 14 \cdot 10^{-8}$ M/mg Chlorophyll, wobei Cu (I) und Cu (II) in wechselndem Verhältnis gemessen wurde. Es wurde gemessen, daß $4 - 6 \cdot 10^{-8}$ M/mg Chlorophyll durch die verwendeten Reagentien eingeschleppt wurden.

Bei diesen Versuchen betrug die Chlorophyllkonzentration 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Die Bindungs- und Reduktionskapazität der Chloroplasten schwankt sehr stark von Präparation zur Präparation, ist aber innerhalb einer Präparation reproduzierbar. Deswegen wurde bei Vergleichsmessungen stets dieselbe Präparation verwendet.

IV) Messung von Absorptionsänderungen

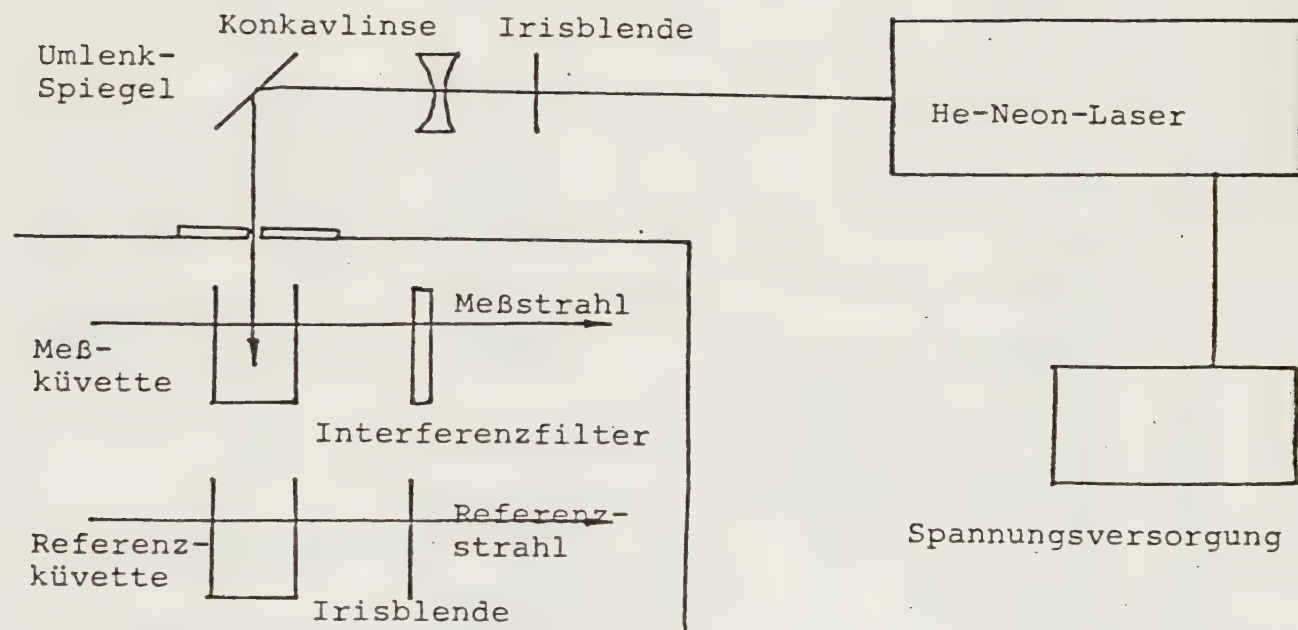
Zur Messung der Absorptionsänderungen von künstlichen Akzeptoren, die durch Chloroplasten im Licht reduziert werden, wurde ein Cary 15-Absorptionsspektrometer für zusätzliche Bestrahlung adaptiert. Die Meßküvette wurde durch einen aufgeweiteten Laserstrahl rechtwinklig zur Meßrichtung bestrahlt. Abb.

Hierfür wurde ein Siemens Polytec Laser benutzt. Es handelt sich um einen He-Neon Laser mit 15 mW Ausgangleistung und einer Wellenlänge von 632 nm. Die Photodiode des Absorptionsspektrometers wurde durch ein Interferenzfilter passender Wellenlänge geschützt. Der Referenzstrahl wurde mit einer Irisblende in gleichem Maße abgeschwächt.

Abb. (22) zeigt ein Schema der Meßanordnung.

Abb. 22

Schema des zur Bestrahlung adaptierten Cary-15-Absorptionsspektrometer



Cary-15-Absorptionsspektrometer

V) Fluoreszenz- und Lumineszenzmessungen

Es wurde ein Laser-Phosphoroskop konstruiert, das Messungen der Fluoreszenzintensität, der Lumineszenzintensität im Zeitbereich von 50 μ sec bis 60 msec sowie der Abklingkinetiken erlaubt. Die Proben temperatur kann bis 77°K gesenkt werden, die Meßwerte analog oder digital verarbeitet werden. Abb. (23) zeigt ein Schema des Apparates mit allen weiteren Zusatzgeräten, die Abb. (24 + 25) zeigen charakteristische Messungen.

Abb. 23

Schema des Laser -Phosphoroskops

- 1) Helium-Neon-Laser von Siemens-Polytec; 15 mW Ausgangsleistung;
- 2) Rotierende Sektorenscheibe mit variabler Geschwindigkeit
PAR Modell 192
- 3) Umlenkspiegel
- 4) Probe
- 5) Vakuumgefäß
- 6) Monochromator von Jobin Yvon Division
- 7) Filterrad
- 8) Shutter
- 9) Peltier-gekühltes Gehäuse von Products for Research Inc.,
Modell TE 104 für Photomultiplier C 31034A von RCA
- 10) Temperaturmessung mit Eisen-Konstantan-Thermoelement und
Millivoltmeter TE 923 von Tekelec Airtronic
- 11) Hochstabilisiertes Netzgerät NUP BN 601 von Knott Electronic
- 12) Stromversorgung für die Photomultiplierkühlung Products for
Research Inc, Modell TE 104
- 13) Lock-In-Verstärker GV 9031 von EGB
- 14) Gleichstromverstärker GV 9031 von EGB
- 15) 200 Punkt-Speicher DL 102 von Data Lab Ltd, England
- 16) XY-Bidschirm 7060 Canberra-Electronic
- 17) XY-Schreiber Omnigraph 2000 von Houston Instruments
- 18) Wasserkühlung
- 19) Stromversorgung für den Laser von Siemens Polytec
- 20) Steuergerät für die rotierende Sektorenscheibe PAR Modell 192
- 21) Vakuum-Diffusionspumpe zur Thermoisolierung

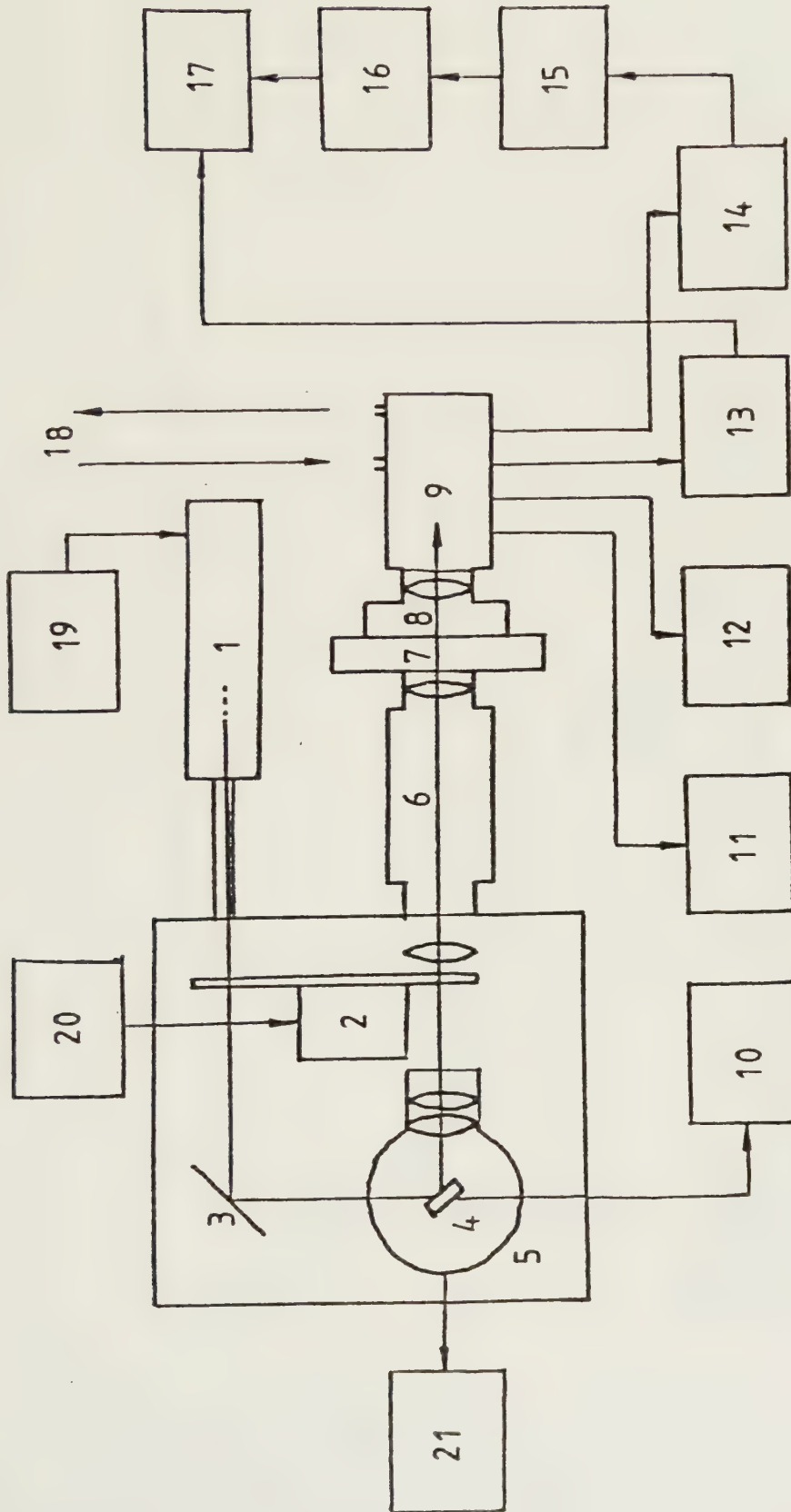


Abb. 21
Schema des Laser-Phosphoroscops

Abb. 24

Messung der Abklingkinetiken der Lumineszenz

Der Bereich von 150 μsec bis 60 msec kann mit 3 Messungen erfaßt werden. Da die Anregungszeiten mit der Rotorgeschwindigkeit variieren, schließen die Kurven nicht exakt aneinander an. Jeder Zeitbereich umfaßt 200 Meßpunkte.
 19°C; 50 μg Chl/ml; 4000 Durchläufe; Verstärkungsbereich $500 \cdot 10^{-9}$; Multiplikationsspannung 1800 V; Zeitkonstanten 0.03 msec, 0.1 msec, 1msec.



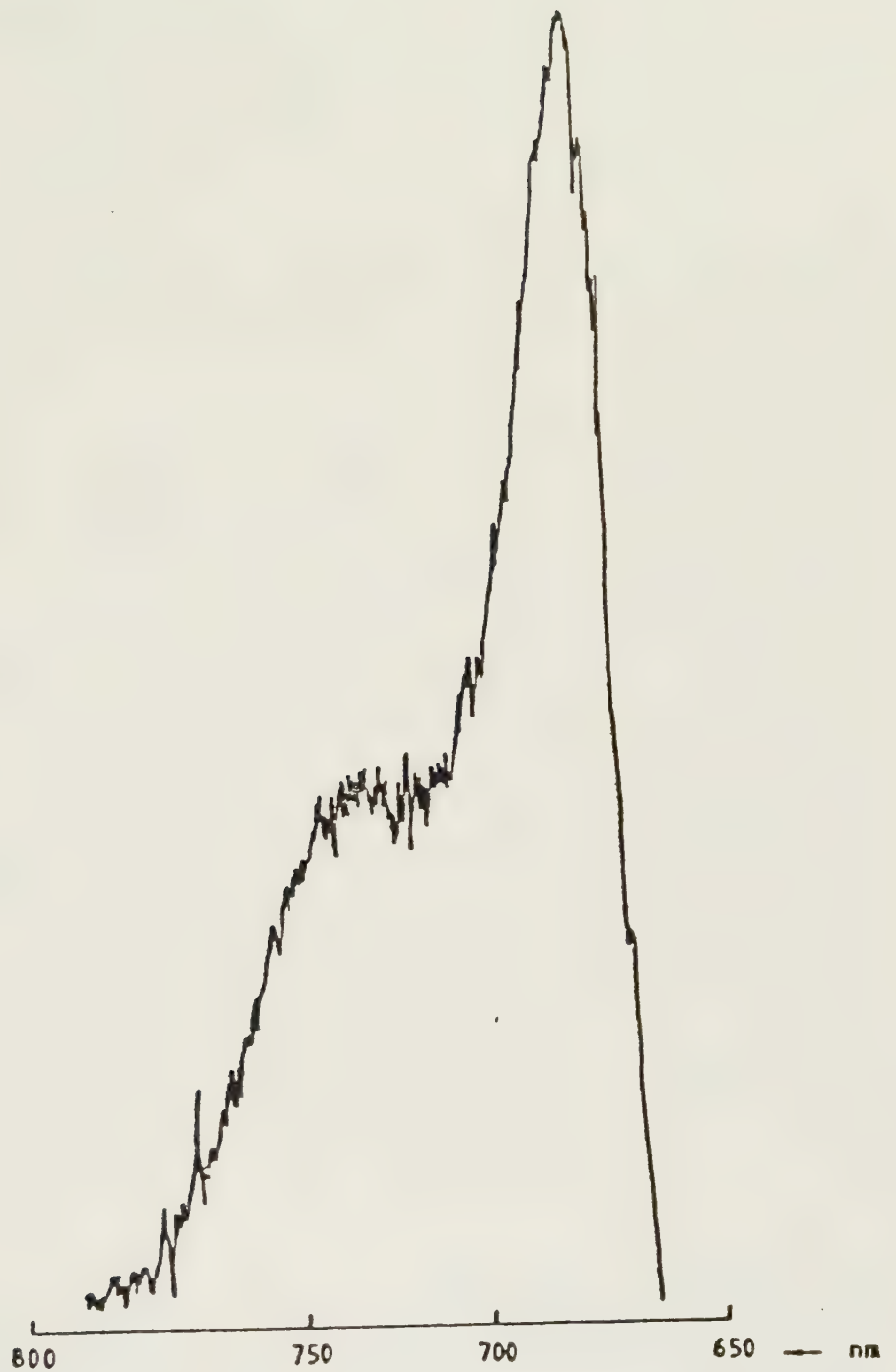


Abb. 25

Die 20 msec-Lumineszenz eines Trauerweidenblattes

Multiplierspannung 1000 V; Lock-In-Verstärker: Empfindlichkeit 100 μ V, Bandpass 20 Hz, $Q = 5$, Zeitkonstante 3 sec; Wellenlängenvorschub manuell; 24°C.

Resultate und Interpretationen

I) Die Stelle der Inhibierung im Photosystem II

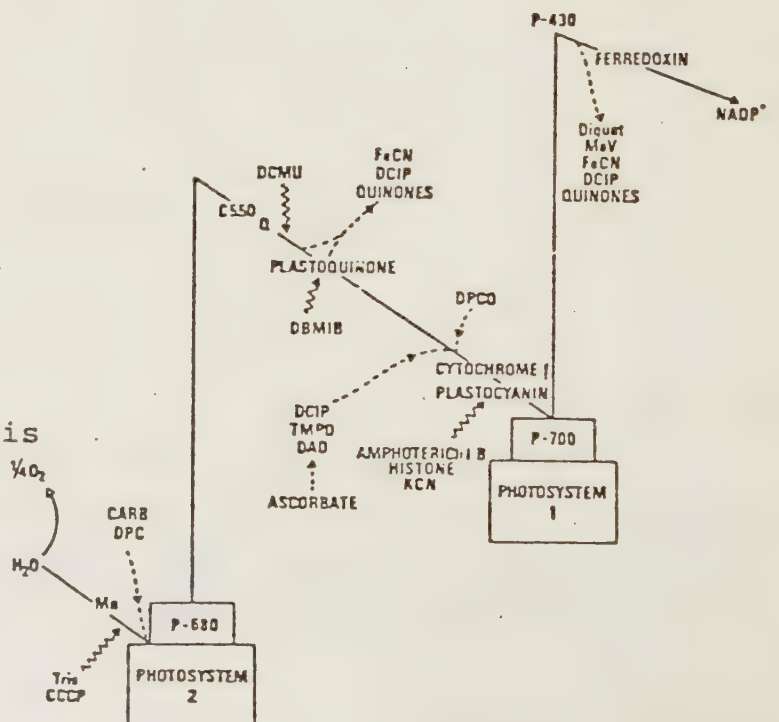
A) Untersuchung von Teilsequenzen des Elektronentransportes

Die Untersuchung von Teilsequenzen des photosynthetischen Elektronentransportes mit Hilfe verschiedener Donor/Akzeptorsysteme zeigt, daß PS I resistenter gegenüber der Inhibierung durch Cu(II) im Licht ist als PS II. (Tab. 27). Dies deckt sich mit den bisher veröffentlichten Daten (Vierke und Struckmeier 1977), wurde hier aber noch einmal untersucht, da Cu(II) mit den bisher verwendeten Reagentien DPC und DCIP wechselwirkt. Insbesondere das Experiment mit Silicomolybdat als Akzeptor in Gegenwart von DCMU zeigt die Empfindlichkeit von PS II gegenüber Cu(II), während das Experiment mit Mn(II) als Donor und Methylviologen als Akzeptor die geringere Empfindlichkeit von PS I bei dieser Cu(II)-Konzentration zeigt. Cu(II) reagiert mit keinem der bei diesen Experimenten verwendeten Reagentien. Die Photooxidation von Mn(II) wird von der Cu-Inhibierung kaum beeinflusst. Dies läßt darauf schließen, daß die Inhibierungsstelle in PS II auf der oxidierenden Seite des Reaktionszentrums vor dem Ort der Mn-Photooxidation liegt, dieses selbst von Cu aber nicht angegriffen wird (Abb. 26). Dieses Ergebnis stimmt mit Messungen von Cedeno-Maldonado und Swader (1972) nicht überein. Deswegen wird es im Folgenden mit einer anderen Methode noch einmal überprüft.

Abb. 26

Hill-Bendall-Schema des Elektronentransportes mit künstlichen Donor-Akzeptor-Systemen und Inhibitoren nach Bishop (1974)

Abkürzungen siehe Verzeichnis



Tab. 27

Wirkung von Cu(II)-Inkubation im Licht auf verschiedene Teilsequenzen des Elektronentransportes

Inkubationszeit 2 min

Donor / Akzeptor	Kontrolle $\mu\text{äqu.}/\text{mg Chl h}$	Inkubierte	% der Kontrolle	
H ₂ O — Simo+DCMU	104	43	41	
H ₂ O — MeV	97	50	52	a)
DPC — MeV	112	61	54	a)b)
DPC — DCIP	78	41	53	a)b)
DCIP/Asc — MeV	181	181	100	a)

Inkubationszeit 5 min

H ₂ O — Simo+DCMU	104	0	0	
H ₂ O — MeV	137	0	0	
Benz — MeV	71	0	0	b)
Mn(II) — MeV	21	19	90	b)
Asc — MeV	82	0	0	b)

a) Cu(II) wird von Ascorbat reduziert, von DPC und Benzidin komplexiert. Deswegen wurden die Chloroplasten nach der Inkubation abzentrifugiert und resuspendiert, um die Reaktion überschüssigen Kupfers mit den Reagentien zu vermeiden.

b) Diese Chloroplasten wurden 2 min lang in einem Wasserbad bei 52 °C inaktiviert

Konzentrationen:

5 $\mu\text{M}/\text{L}$ Benz, 100 $\mu\text{M}/\text{L}$ MnSO₄, 3 mM/L DPC, 3 mM/L Na-Asc, 4 $\mu\text{M}/\text{L}$ DCMU, 8 $\mu\text{M}/\text{L}$ DCIP, 0,4 mg/ml Simo, 0,5 mM/L CuSO₄

B) Die Induktion der Fluoreszenz

Folgende drei Reaktionen bewirken die Transformation der Lichtquantenenergie in freie chemische Energie:

Lichtabsorption durch das
Antennenpigmentsystem



Energieleitung zum Reaktions-
zentrums-Chlorophyll P_{680}



Primäre photochemische
Reaktion



Durch die Lichtabsorption wird an irgendeinem Pigmentmolekül des Antennensystems ein Anregungszustand erzeugt, der dann vom Reaktionszentrum P_{680}Q eingefangen wird, und dort zur primären Ladungstrennung führt.

Um diese Prozesse von Energieleitung und -einfang zu studieren, sind sehr schnelle Messungen notwendig, da sie im Sub-Nanosekundenbereich verlaufen.

Ein Reaktionszentrum mit reduziertem Akzeptor Q^- ist für eine weitere Ladungstrennung blockiert und führt mit einer Seitenreaktion zu verstärkter Fluoreszenz:



Nach Einschalten der Beleuchtung stellt sich eine Gleichgewichtskonzentration von funktionell aktiven und von blockierten Zentren ein. Dieser Prozeß bestimmt die Induktionsphase der Fluoreszenz im Sekundenbereich (Papageorgiou 1975).

Daher kann die Fluoreszenzintensität von Chlorophyll a als ein Indikator des Redoxzustandes des primären Elektronenakzeptors Q betrachtet werden. Sie ist maximal, wenn Q vollständig reduziert, und damit alle Zentren im blockierten Zustand sind, und sie ist minimal, wenn Q vollständig oxidiert ist. Die Fluoreszenzinduktionskurve spiegelt so den zunehmenden Reduktionsgrad von Q^- .

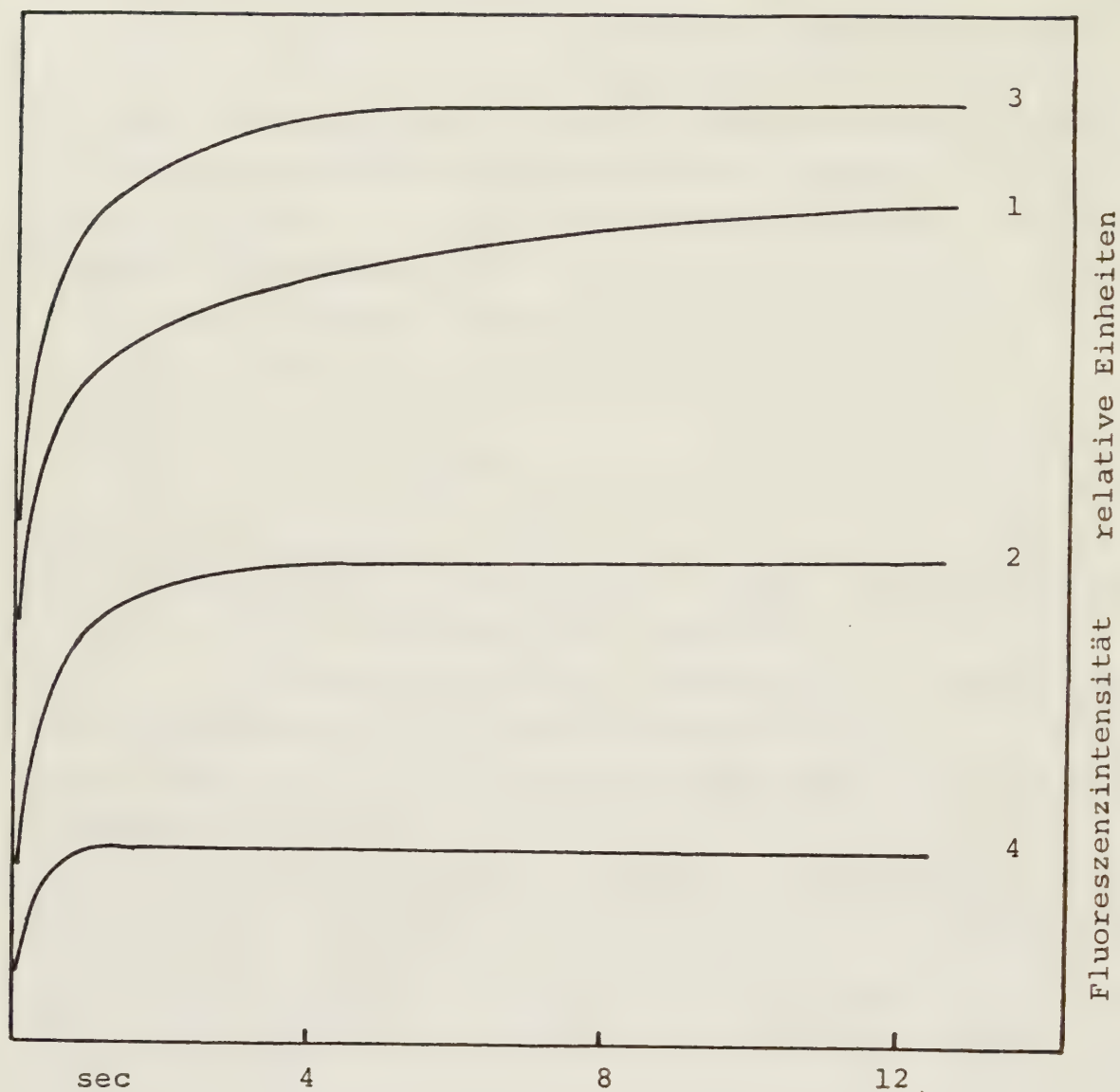
Wie Abb. 28 zeigt, bewirkt eine Blockierung des Elektronentransportes durch DCMU eine Erhöhung der Gleichgewichtswertes der Fluoreszenz, während die Zugabe eines Akzeptors sie senkt. DCMU inhibiert die Oxidation von Q^- durch den Plastochinonspeicher zwischen den Photosystemen und stimuliert so die Akkumulation von Q^- . Entsprechend erreicht die Fluoreszenz ihren Gleichgewichtswert schneller. Den entgegengesetzten Effekt bewirkt die Zugabe eines Akzeptors: Der Gleichgewichtswert der Fluoreszenz sinkt stark ab. Silicomolybdat ist ein sehr effektiver Akzeptor und oxidiert Q^- selbst noch in der Gegenwart von DCMU.

Diese Effekte sind hinreichend bekannt und lassen sich daher zur Untersuchung der reduzierenden Seite des Reaktionszentrums von PS II verwenden. Der Verlauf der Fluoreszenz-Induktionskurve unter Einfluß von Akzeptoren oder Blockern ist ein empfindlicher Indikator von Prozessen, die dort ablaufen.

$CuSO_4$ hat auf die Fluoreszenzkinetiken im Sekundenbereich keinen Einfluß (Abb. 29). Dies bedeutet, daß die Oxidation von Q^- durch den Plastochinonspeicher nicht beeinflußt wird. Weiter kann geschlossen werden, daß die oben beschriebenen drei Reaktionen, durch die im Photosystem II die Transformation der Energie der absorbierten Lichtquanten in freie chemische Energie ausgeführt wird, ebenfalls nicht beeinflußt werden. Die physiologischen Funktionen des Reaktionszentrums von Photosystem II bleiben intakt.

Dieses Ergebnis erlaubt die Lokalisierung der Stelle, an der $Cu(II)$ den Elektronentransport unterbricht. Nach den Ergebnissen von Cedeno-Maldonado und Swader (1972) wird die $Mn(II)$ -Photooxidation stärker inhibiert als die Sauerstoffentwicklung. Daher käme das Reaktionszentrum als Ort der Inhibierung in Frage.

Dies kann jetzt ausgeschlossen werden. Da $Mn(II)$ vom primären Donor Z_1 des Zentrums photooxidiert wird (Govindjee 1976), liegt die Inhibierungsstelle wahrscheinlich auf dessen oxidierender Seite. (siehe Seite 44)



Abb, 28

Fluoreszenzinduktion von Thylakoiden

- 1) ohne Zusätze
- 2) + 2mM/L Fecy
- 3) + 2mM/L Fecy + 4 μ M/L DCMU
- 4) + 200 μ M/L Simo + 4 μ M/L DCMU

Die Thylakoiden wurden zusätzlich mit 5 μ M/L A23187 entkoppelt. Messung bei gestopptem Sektor; Zeitkonstante 100 msec; Verstärkungsbereich 10^{-5} ; Multiplierspannung 1800 V; 25% der maximalen Laserintensität.

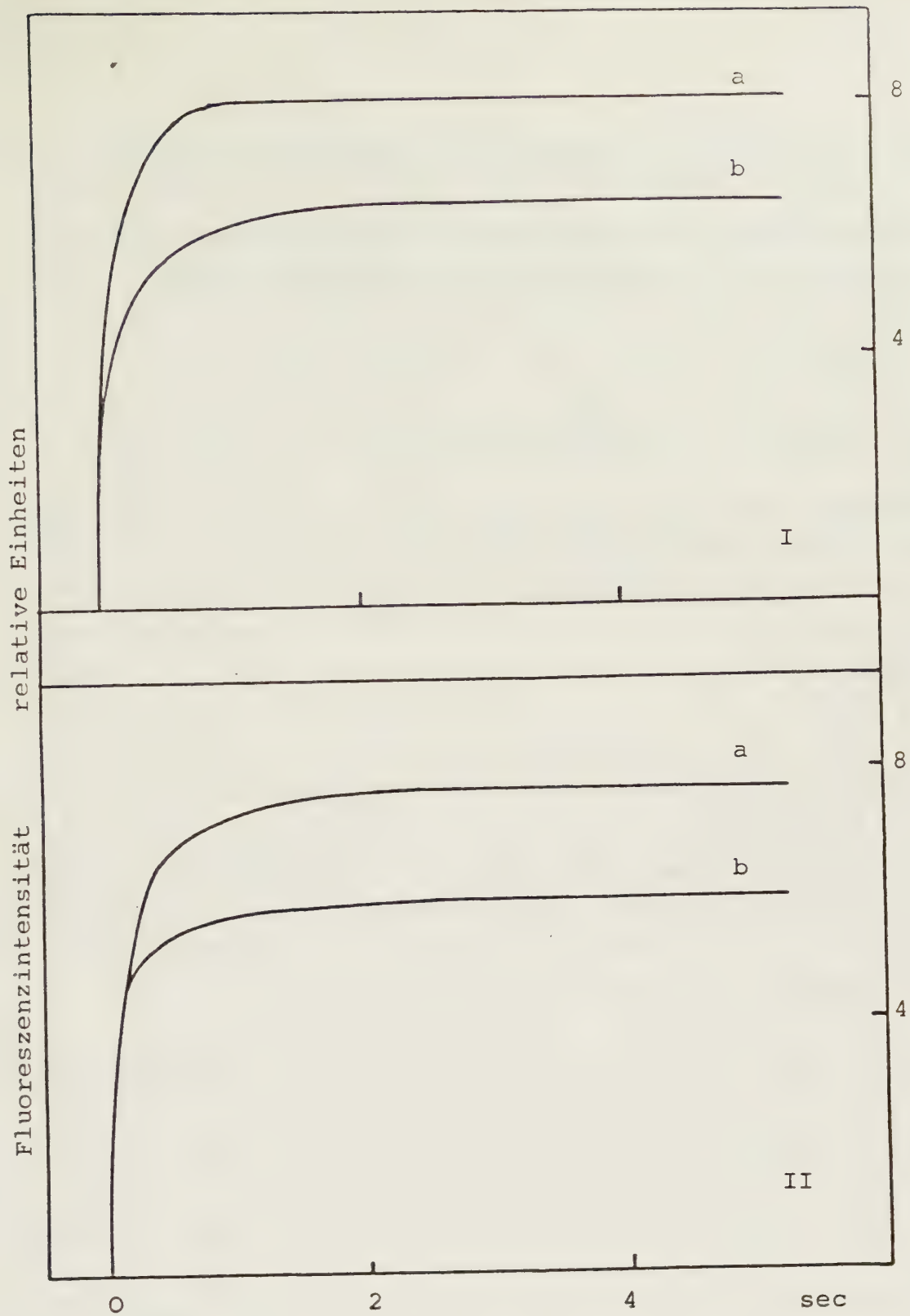


Abb. 29

Fluoreszenzinduktion von Thylakoiden

I) Kontrollmessung

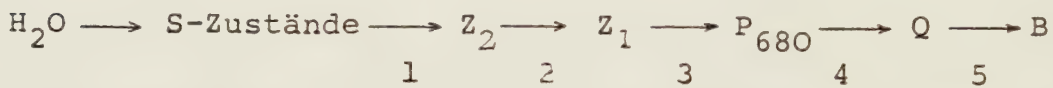
II) Cu(II)-lichtinkubierte Thylakoiden

a) + 4 μ M/L DCMU b) + 2mM/L Fecy

Weiter Daten wie Abb. 29

C) Die Induktion der Lumineszenz im Millisekundenbereich

Die Komponenten des Elektronentransportes von Photosystem II können schematisch in linearer Anordnung gezeigt werden:



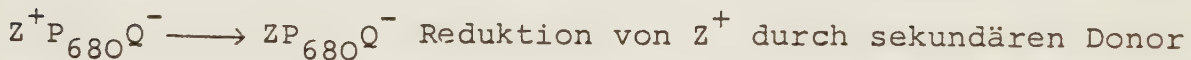
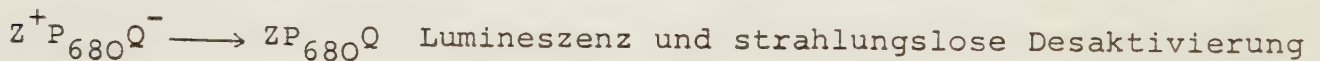
wobei die Pfeile die Richtung des Elektronentransportes anzeigen.

Den Redoxreaktionen können nach den neuesten Ergebnissen folgende Halbwertszeiten zugeordnet werden (Crofts 1977)

- 1 0,1 - 4 msec, abhängig vom S-Zustand
- 2 15 μsec
- 3 1 μsec
- 4 1 nsec
- 5 0,2 - 0,6 msec

Die Lumineszenz, die mehr als 0,1 msec nach Beleuchtungsende beobachtet wird, wird auf jeden Fall auch durch die Reaktionen 1 und 5 beeinflusst, also durch den Redoxzustand des wasserspaltenden Enzymsystems und den Plastochinonspeicher.

$\text{Z}^+\text{P}_{680}\text{Q}^-$ wird in drei Reaktionen abgebaut, entsprechend vier möglichen Zuständen des Reaktionszentrums.



(Es ist noch umstritten, ob die Rekombination von $\text{Z}^+\text{P}_{680}\text{Q}^-$ oder die von $\text{P}_{680}^+\text{Q}^-$ zur Lumineszenz führt. Dies ist aber für die momentane Betrachtung unerheblich).

Von diesen vier möglichen Zuständen kann nur ZP_{680}Q nach Anregung durch Licht zur Lumineszenz beitragen. Reaktionszentren in den anderen Zuständen können keine weiteren Ladungstrennungen mehr ausführen und sind daher für Lichtanregung blockiert. Die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen diesen vier Zuständen

wird von der Lumineszenzinduktionskurve gespiegelt (Itoh und Murata 1973). Ein schneller Anstieg zu einem Maximalwert, gefolgt von einer langsamen Einstellung eines Gleichgewichtswertes kann bei entkoppelten Thylakoiden beobachtet werden. Die Zugabe eines Elektronenakzeptors wie Fecy oder Methylviologen erhöht die Konzentration an Zentren im aktiven Zustand $ZP_{680}Q$ durch die Oxidation von $ZP_{680}Q^-$ und sorgt so für eine Erhöhung der Lumineszenzintensität (Abb.30), während $MnSO_4$ als Donor durch die Reduktion von $Z^+P_{680}Q^-$ die Konzentration an lumineszierenden Zentren herabsetzt und einen blockierten Zustand erzeugt. Infolgedessen verringert $MnSO_4$ die Lumineszenzintensität. Abb.31 zeigt, daß Cu-Lichtinkubation die Lumineszenzintensität verringert. Dies entspricht einer erhöhten Konzentration an blockierten Zentren. Da die Fluoreszenzergebnisse zeigten, daß die Oxidation von Q^- nicht beeinflusst wird, ist anzunehmen, daß Cu(II) die Reduktion von Z^+ durch den natürlichen Elektronentransport beeinträchtigt. Abb.31 und Tab.27 zeigen, daß $MnSO_4$ selbst noch bei Cu(II)-inhibierten Thylakoiden als Donor fungieren kann. Dies ist ein weiterer Hinweis, daß Z_1 intakt bleibt.

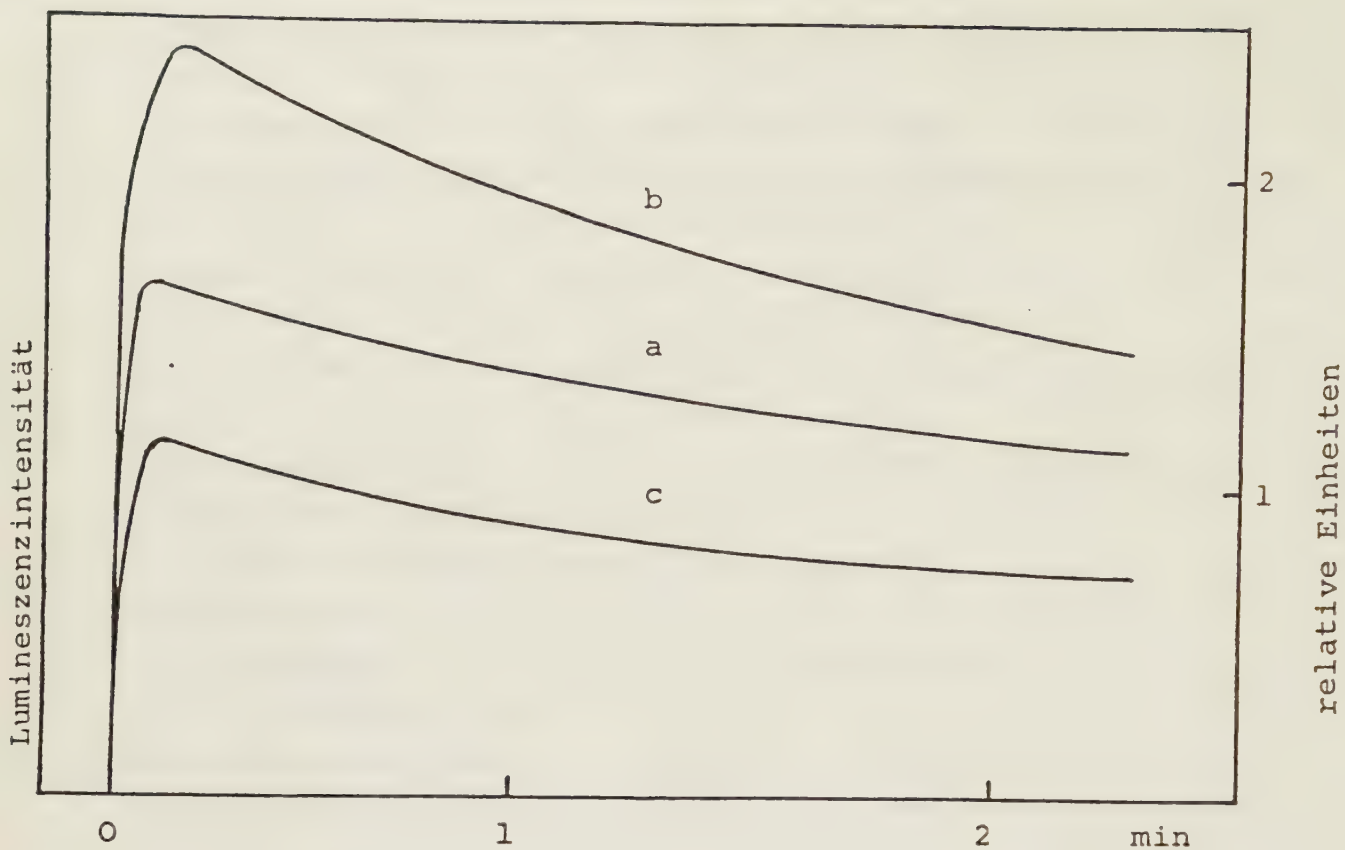


Abb. 30

Der Einfluß von MnSO_4 und Methylviologen auf die Induktion der Lumineszenz nach 1 msec

a) mit 2.5 mM/L NH_4Cl entkoppelte Thylakoiden

b) Zusatz von 0.1 μM /L Methylviologen

c) Zusatz von 0.1 μM /L Methylviologen + 4 mM/L MnSO_4

Weitere Daten wie Abb. 32

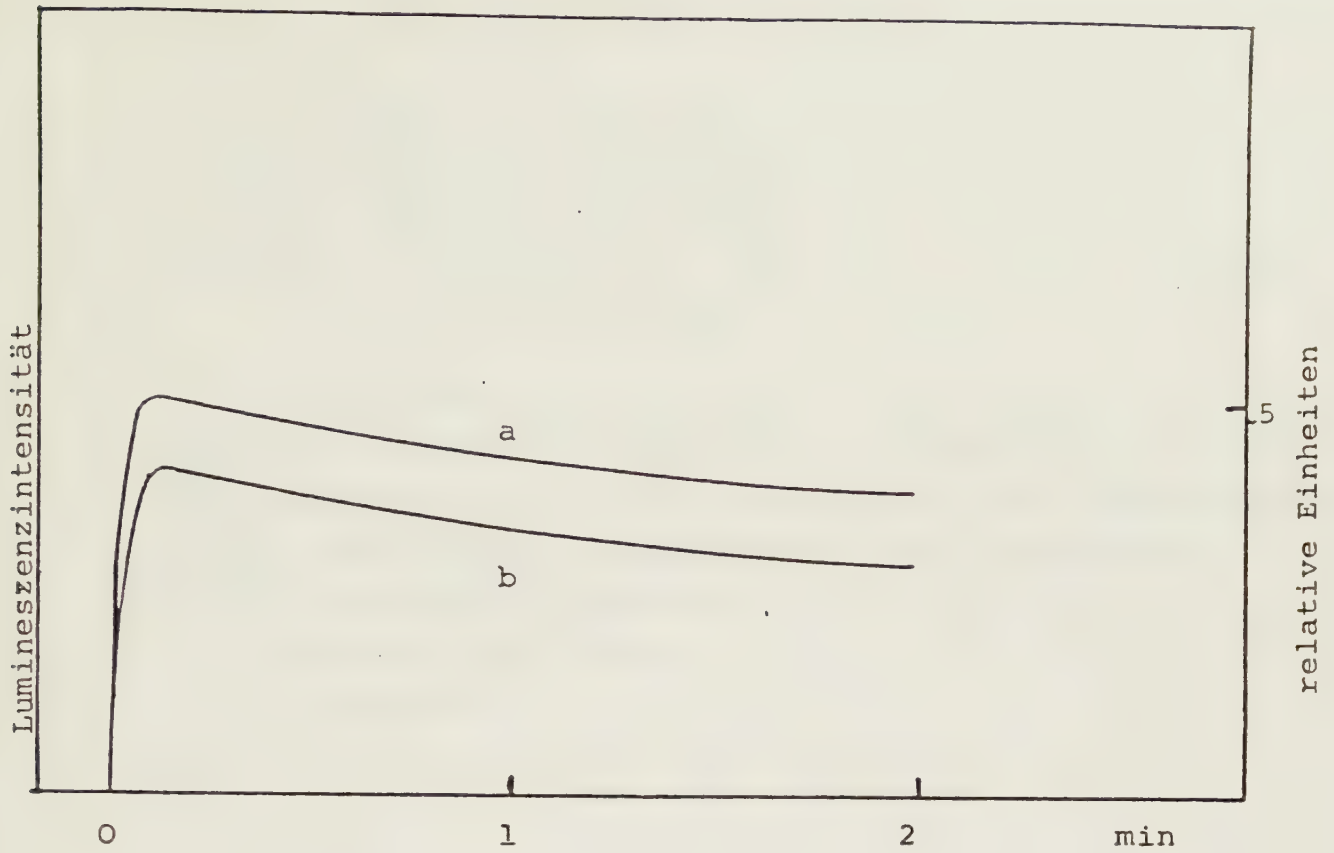


Abb. 31

Der Einfluß der Lichtinkubation mit CuSO_4 auf die Induktion der Lumineszenz nach 1 msec

- a) Cu(II) -lichtinkubierte Thylakoiden, mit 2.5 mM/L NH_4Cl entkoppelt
- b) Zusatz von 4 mM/L MnSO_4

Weitere Daten wie Abb.30

D) Die Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz im Millisekundenbereich

Durch Temperaturerniedrigung werden fast alle Reaktionen des photosynthetischen Elektronentransportes verlangsamt und in zunehmendem Maße blockiert; die primären Photoreaktionen der Photosysteme I und II treten aber noch bei wenigen Grad Kelvin auf. Für die Rückreaktion von Photosystem II

$Z^+P_{680}Q^- \longrightarrow ZP_{680}Q + h\nu$ unter Emission von Lumineszenz wurden bei Temperaturen unter 0°C Halbwertszeiten von einigen msec gemessen (Malkin und Bearden 1975, Mathis und Vermeiglio 1974). Unterhalb von -10°C kann im Millisekundenbereich eine starke Stimulierung der Lumineszenz beobachtet werden. Dies ist darauf zurückzuführen, daß der sekundäre Elektronentransport blockiert wird und so die Konzentration an Lumineszenzvorläufern $Z^+P_{680}Q^-$ viel langsamer durch Redoxreaktionen verringert wird. Das Minimum der Lumineszenzintensität liegt bei -10°C . Dies entspricht dem Gefrierpunkt des Wassers in den Chloroplasten. Eine starke Stimulierung der Lumineszenz im Bereich von 0,1 - 40 msec beobachteten auch Velthuys und Ames (1975). Sie schlossen auf eine Blockierung des sekundären Elektronentransportes. Da sie außerdem eine starke Abhängigkeit von den S-Zuständen bei diesen Temperaturen feststellten, lokalisierten sie die Blockierungsstellen auf der Elektronentransportstrecke vom wasserspaltenden Enzymsystem zum Reaktionszentrum von Photosystem II.

Inoue und Shibata (1978) haben mit einer eleganten Methode die Temperaturempfindlichkeit der Reaktionen des wasserspaltenden Enzymsystems studiert. Sie beobachteten die Effekte von Blitz-Vorbeleuchtung und Beleuchtung durch kontinuierliches Licht auf die Glühkurven, die beim Aufwärmen der Chloroplasten gemessen werden können. Sie kamen zu folgenden Ergebnissen:

Bindung von H_2O an offene Stellen im wasserspaltenden Enzymsystem

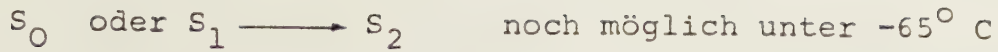
blockiert bei -10°C



" unter -20°C



" unter -35°C



Wie die Abb. 34 u. 35 zeigen, bewirkt die Lichtinkubation Temperaturen über 0°C eine völlige Unterdrückung der Lumineszenz, während bei Temperaturen unterhalb von $-10 - -20^\circ\text{C}$ nur noch ein geringfügiger Einfluß zu beobachten ist.

Wenn man die Ergebnisse von Inoue und Shibata zugrunde legt, sind offenbar Elektronenrücktransportprozesse von S_2 und S_3 trotz Cu(II) -Inhibierung noch möglich, obwohl S_3 nicht uneinflusst bleibt. Damit kommt am ehesten S_4 als Inhibierungsstelle in Frage, oder aber der Übergang $S_4 \longrightarrow S_0$, bei dem das O_2 -Molekül freigesetzt wird.

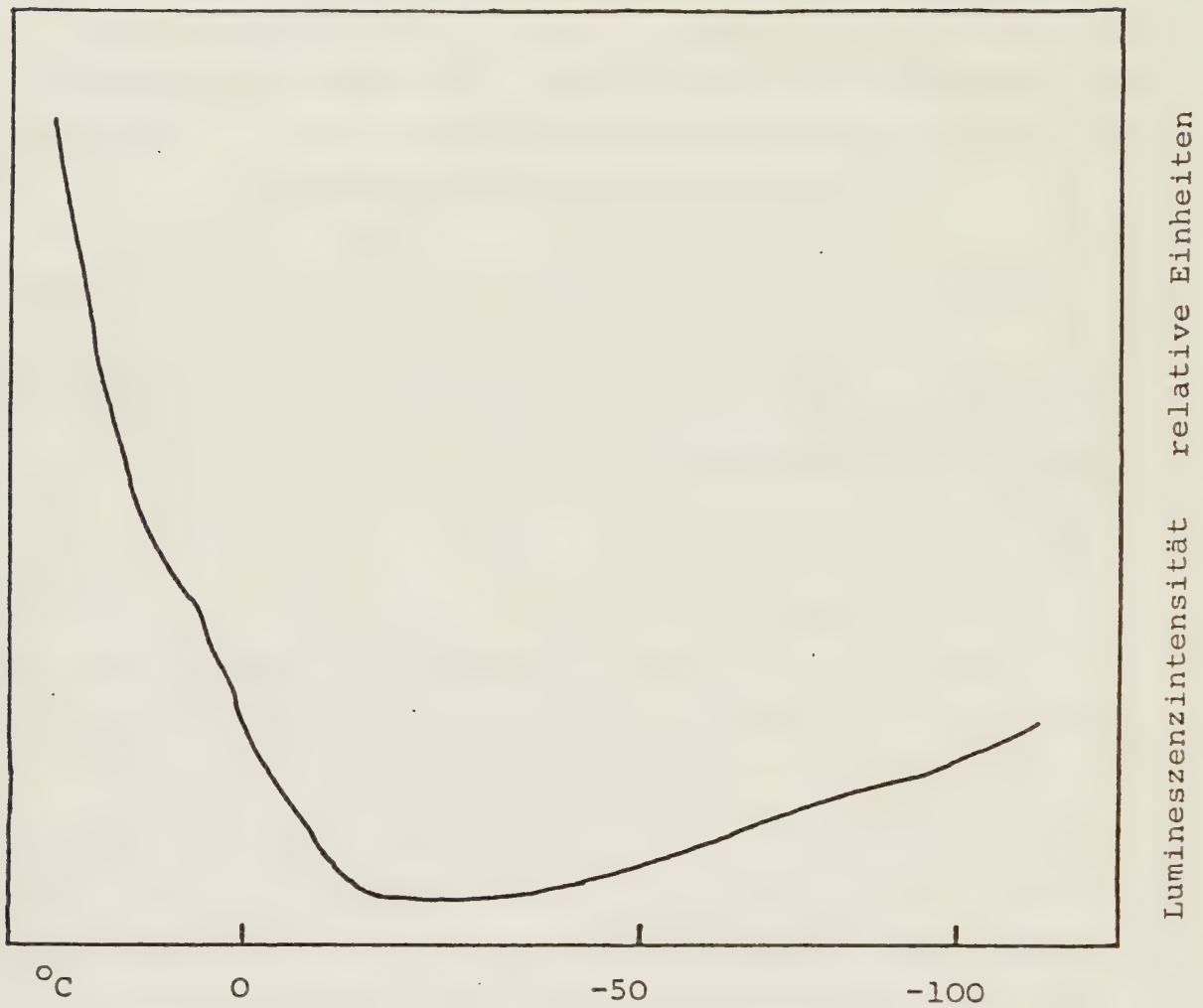


Abb. 32

Temperaturabhängigkeit der 20 msec-Lumineszenz

Multiplierspannung 1000 V, Lock-In-Verstärker: Empfindlichkeit 100 μ V, Bandpass 20 Hz, $Q=5$, Zeitkonstante 30 sec;
Chlorophyllkonzentration 50 μ g/ml

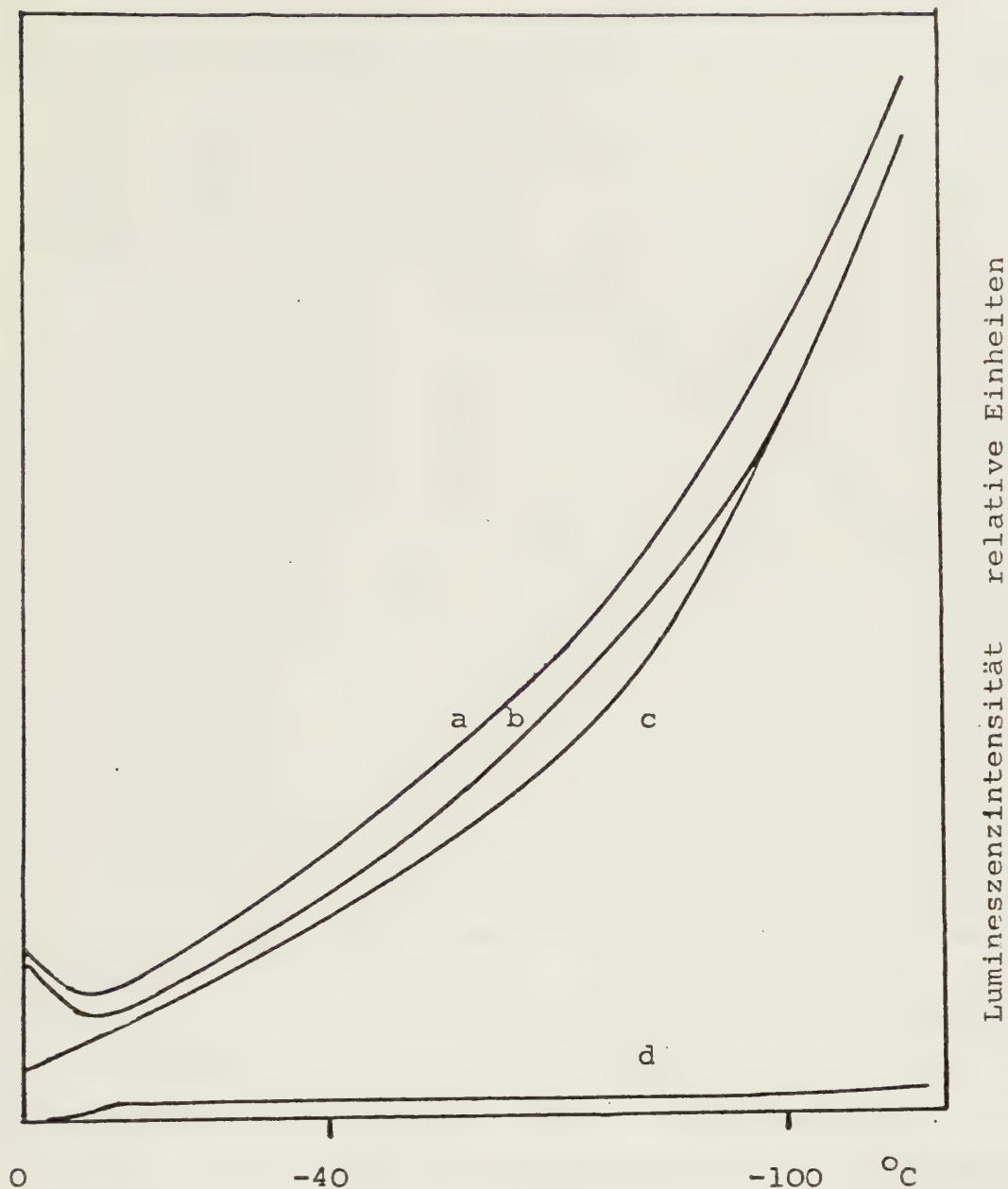


Abb. 33

Temperaturabhängigkeit der 20 msec-Lumineszenz

- a) Chloroplasten ohne Zusätze.
- b) Chloroplasten + 4 $\mu\text{M/L}$ DCMU
- c) Cu(II)-lichtinkubierte Chloroplasten, 100 $\mu\text{M/L}$ CuSO_4
- d) Hitze-desaktivierte Chloroplasten

Weitere Daten wie Abb.32

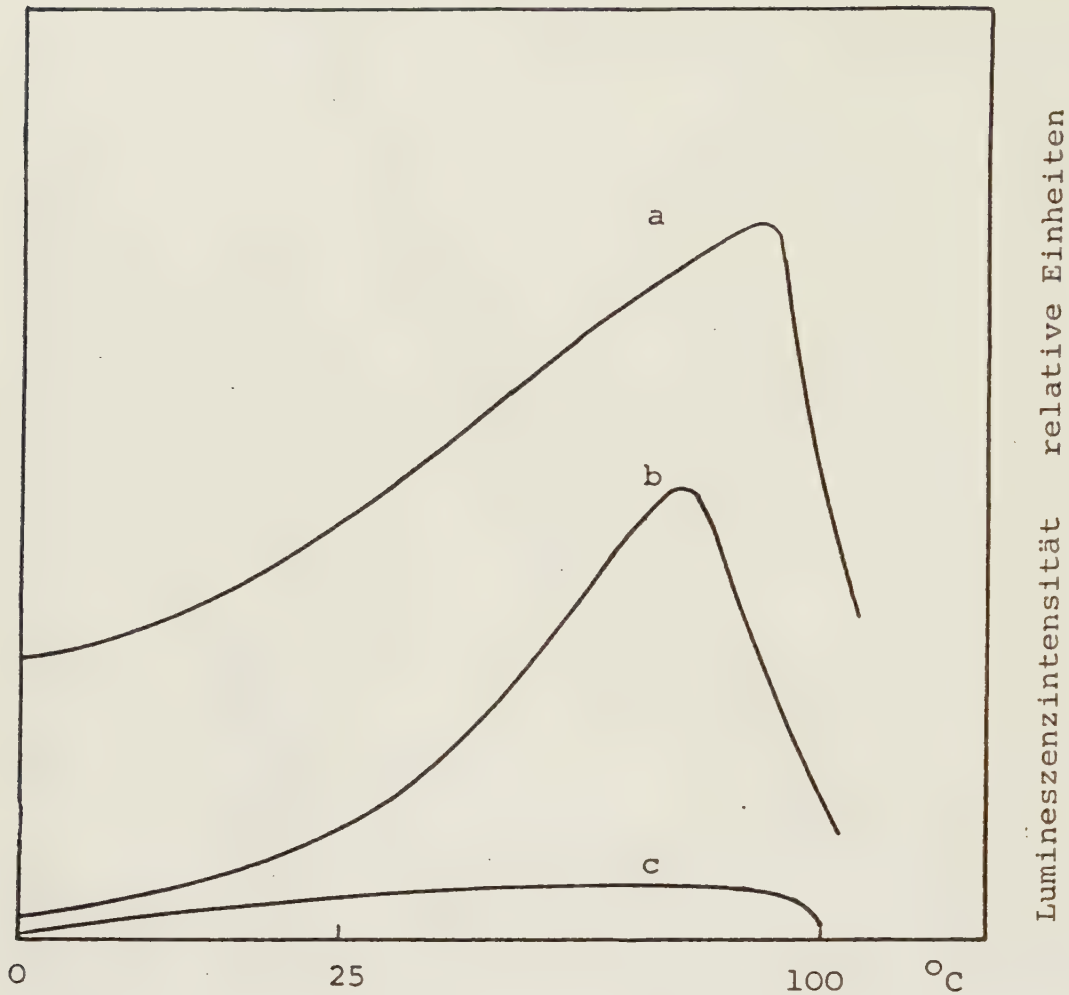


Abb. 34

Temperaturabhängigkeit der 20 msec-Lumineszenz

- a) Chloroplasten ohne Zusätze
- b) Chloroplasten + 4 $\mu\text{M/L}$ DCMU
- c) Cu(II)-lichtinkubierte Chloroplasten, 100 $\mu\text{M/L}$ CuSO_4

Hitze-desaktivierte Chloroplasten zeigen keine Emission mehr bei Temperaturen über 0°C .

Weitere Daten wie Abb. 32

II) Der Mechanismus der Inhibierung

Die Abklingkinetiken der Lumineszenz

Nach dem Mitchellschen Konzept der Photophosphorylierung treibt ein elektrochemischer Potentialgradient über die Chloroplastenmembran die ATP-Produktion. Er beeinflusst die Lumineszenzintensität im Millisekundenbereich stark (Wraight und Crofts 1971). Um diesen Einfluß auszuschalten, wurden weitere Experimente mit ultraschallbehandelten Chloroplasten durchgeführt, die keinen pH-Gradienten ausbilden und diese zusätzlich mit dem K^+ -Ionophor A23187 entkoppelt. Derartige Ionophoren eliminieren die Absorptionsänderung bei 518 nm, die das elektrische Feld über die Membran anzeigt (Bulychev und Vredenberg 1976). Das elektrische Feld bricht unter diesen Bedingungen innerhalb weniger μsec zusammen (Jursinic et al. 1978). Nach Lavorel (1968) ist die Lumineszenzintensität proportional zur Konzentration an PSII-Zentren im Zustand $Z^+P_{680}Q^-$. Abb.36 zeigt, daß die Lumineszenzintensität nach 150 μsec durch die Cu(II)-Inkubation stark abnimmt. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß Cu(II) die Reduktion von Z^+ hemmt, und sich deshalb die Konzentration an Zentren im nicht-lumineszierenden Zustand $Z^+P_{680}Q$ erhöht. Auch der Donor-Effekt von $MnCl_2$ ist wieder zu beobachten. Abb. 37 zeigt, daß Zugabe von $MnCl_2$ vor der Cu(II)-Inkubation das Ausmaß der Inhibierung verringert.

Die Abklingkinetiken der Lumineszenz sind gewöhnlich von komplexer Ordnung und werden deshalb in Segmente unterschiedlicher Dauer eingeteilt. Sie überdecken mehrere Größenordnungen, und es wurde versucht, sie als Summe von einfachen Exponentialfunktionen zu beschreiben (Lavorel 1975). Sie folgen der Abnahme der Lumineszenzvorläufer $Z^+P_{680}Q^-$ und den Änderungen weiterer modulierender Faktoren. Die Abb.36-39 zeigen klar, daß sich die Form der Abklingkinetik durch die Cu(II) Inkubation nur geringfügig ändert, obwohl der Anfangswert der Lumineszenzintensität stark verringert ist. Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß der Rekombinationsprozeß des Zentrums von PSII selbst nicht beeinflusst wird.

Dieses Ergebnis erlaubt aber noch eine weitere Schlußfolgerung: Offenbar kommt die Lumineszenz nach der Cu(II)-Inhibierung nur

von Zentren, die intakt geblieben sind. Es existieren nur lumineszierende oder nicht-lumineszierende Zentren. Daß die Form der Abklingkurve unbeeinflusst bleibt, obwohl ihre Intensität abgenommen hat, ist schlecht vereinbar mit der Annahme teilweise inaktivierter Zentren. Eine sukzessive Inhibierung, wie sie bei der Bindung mehrerer Cu(II)-Ionen zu erwarten wäre, würde den Elektronenrücktransport im selben Ausmaß verlangsamen oder beschleunigen, je nach der Anzahl der pro Zentrum gebundenen Ionen. Dies müßte sich in der Form der Abklingkurve der Lumineszenz spiegeln, aus der die Messungen ein willkürliches Stück herausnehmen. Dies wird aber nicht beobachtet. Daher kann geschlossen werden, daß keine teilweise inaktivierten Zentren existieren. Dies erlaubt aber Aussagen über den möglichen Mechanismus der Inhibierung:

Die Messungen lassen sich am ehesten mit der Annahme erklären, daß pro Sauerstoff entwickelndes Enzymsystem eine Bindungsstelle für Cu(II)-Ionen existiert. Wenn dort ein Ion gebunden ist, ist das Enzymsystem blockiert.

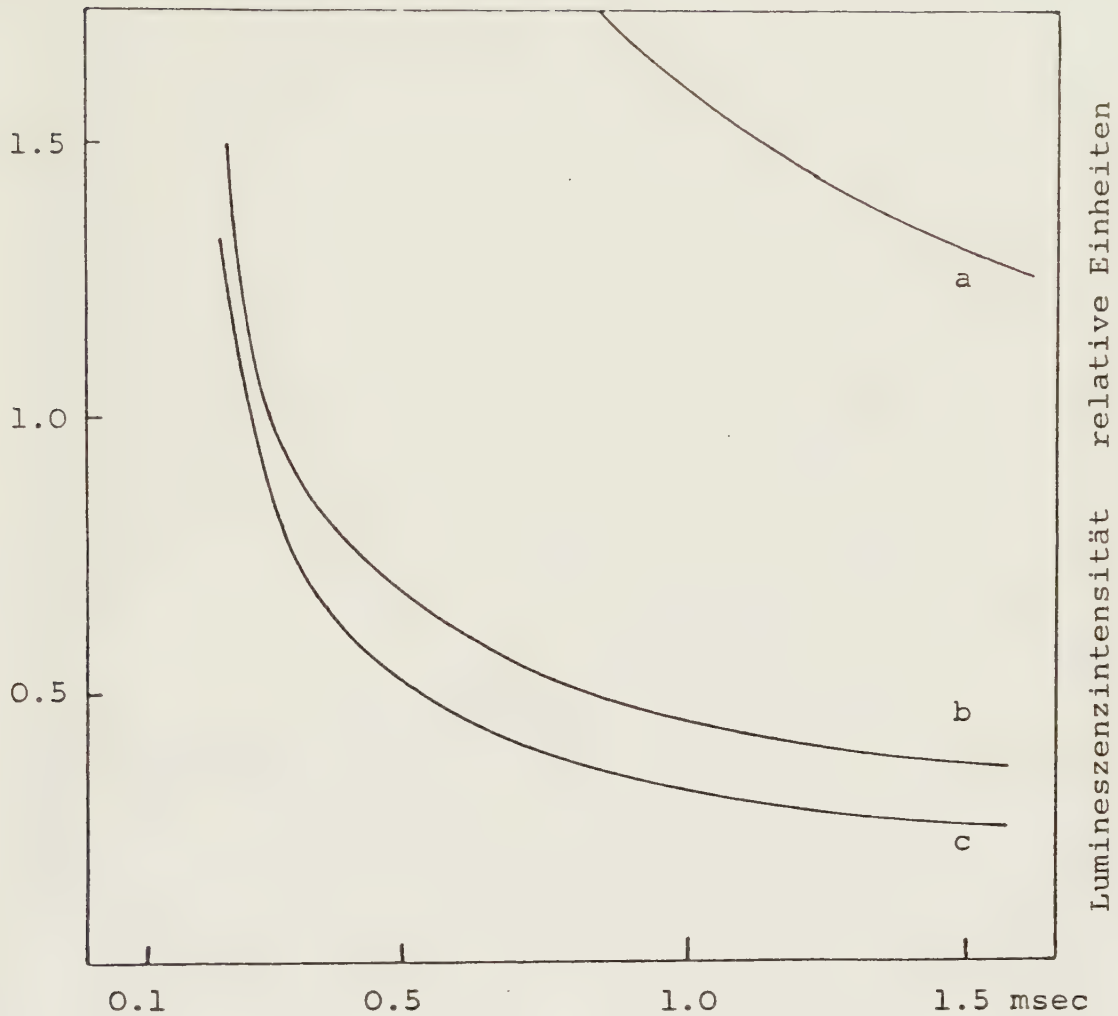


Abb. 36

Abklingkinetik der Lumineszenz von Thylakoiden
Der Einfluß der Lichtinkubation mit Cu(II)

Ultraschallbehandelte Chloroplasten wurden in der Gegenwart von $10 \mu\text{M/L}$ A 23187 mit $100 \mu\text{M/L}$ CuSO_4 3min licht-inkubiert.

Multiplierspannung 1800V; Zeitkonstante 0.03 msec;
 4000 Durchläufe; Verstärkungsbereich $500 \cdot 10^{-9}\text{V}$; 19°C .

- a) Thylakoiden ohne Zusätze
- b) Cu(II)-lichtinkubierte Thylakoiden
- c) wie b), Zusatz von 4mM/L MnCl_2 nach der Inkubation

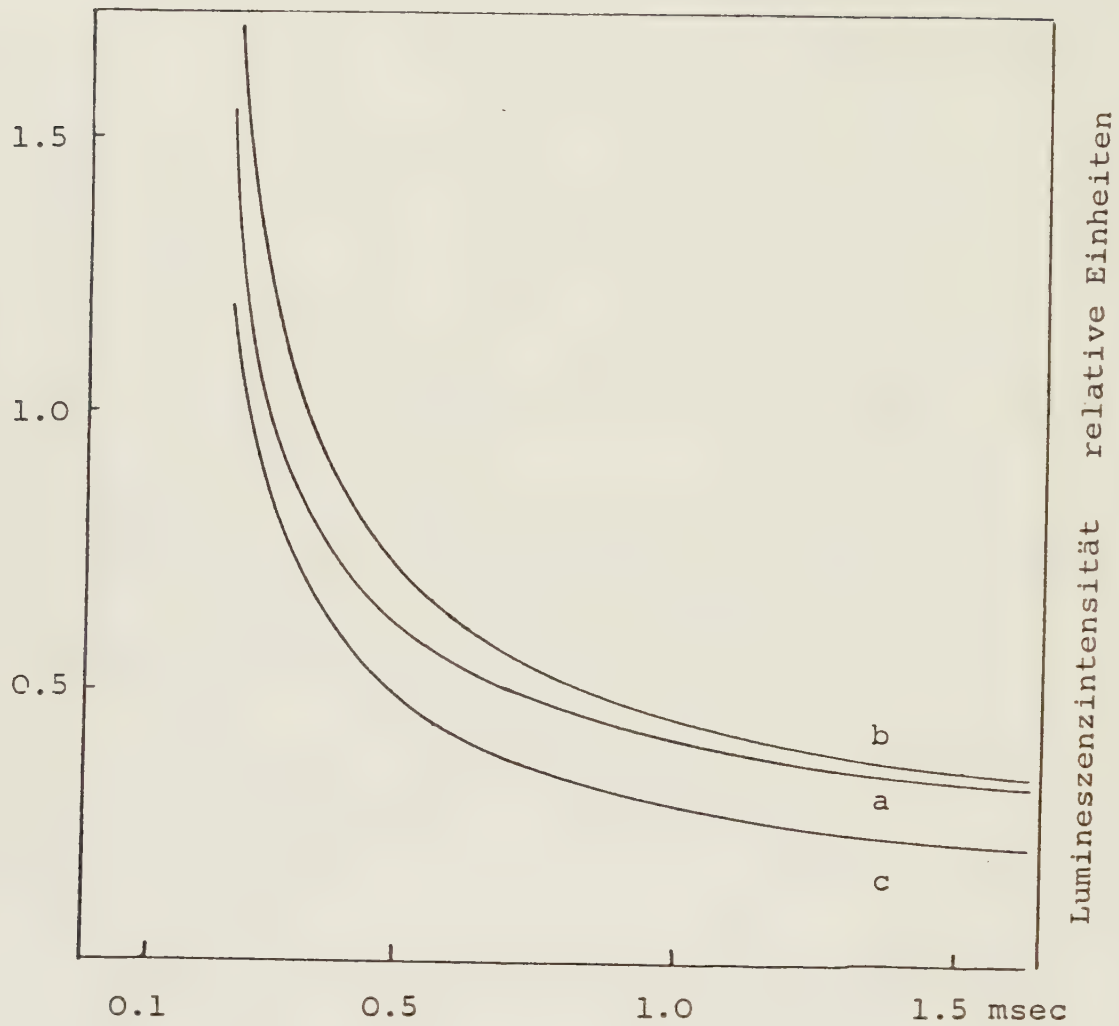


Abb. 37

Abklingkinetik der Lumineszenz von Thylakoiden
Der Einfluß von MnCl_2 auf die Cu(II) -Lichtinkubation

- a) Cu(II) -lichtinkubierte Thylakoiden
 - b) Zugabe von 4 mM/L MnCl_2 vor der Inkubation
 - c) Zugabe von 4 mM/L MnCl_2 nach der Inkubation.
- Weitere Daten wie Abb.36

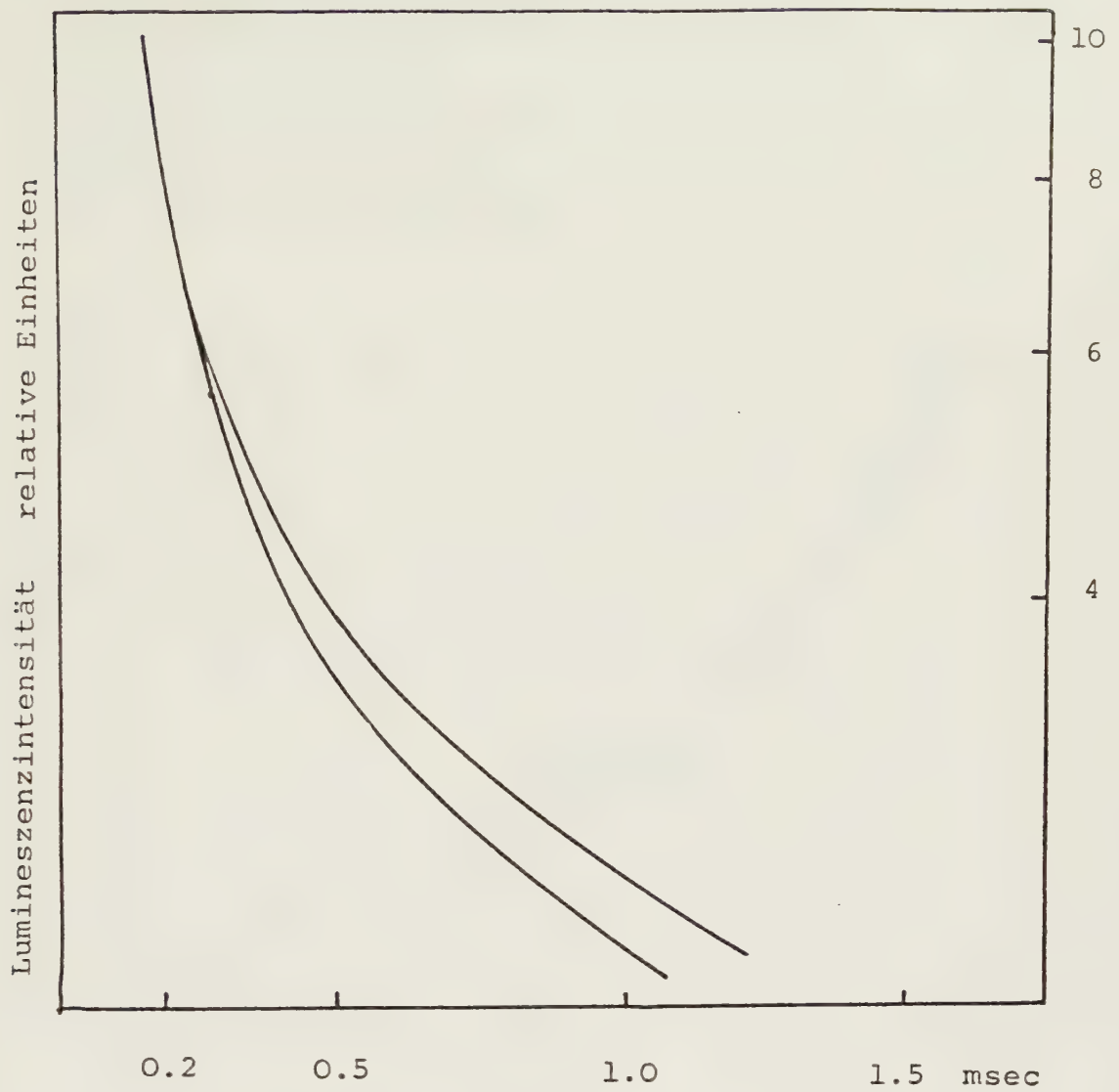


Abb. 38

Abklingkinetik der Lumineszenz in Gegenwart von Mn(II)

Auf 100% normiert. Der Anfangswert der Abklingkinetik Cu(II)-lichtinkubierter Chloroplasten (obere Kurve) beträgt 45% des Anfangswertes der Kontrollmessung (untere Kurve). Weitere Daten wie Abb. 36

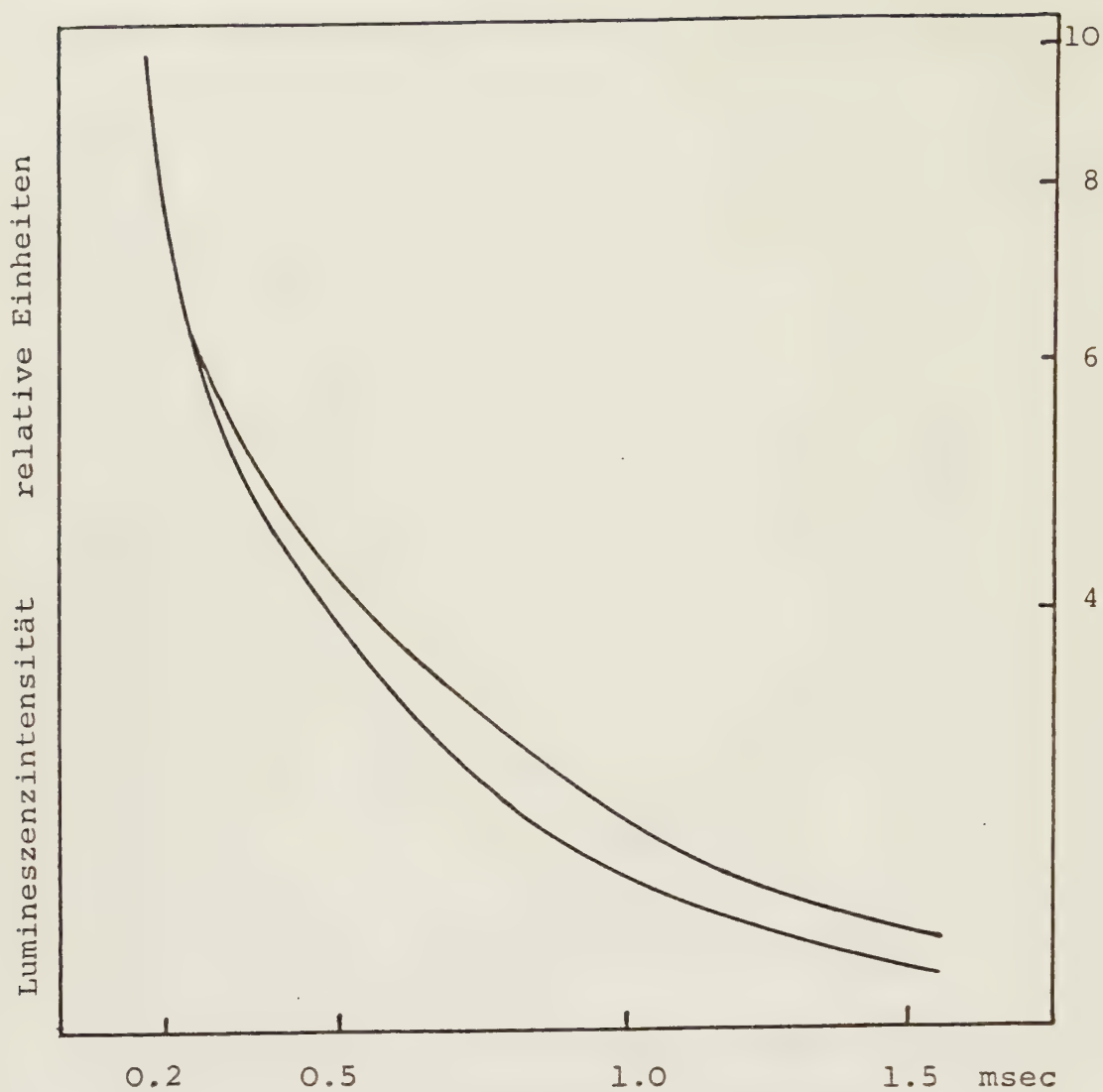


Abb. 39

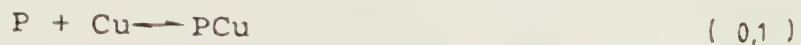
Abklingkinetik der Lumineszenz

Auf 100% normiert. Der Anfangswert der Abklingkinetik Cu(II)-lichtinkubierter Chloroplasten (obere Kurve) beträgt 27% des Anfangswertes der Kontrollmessung (untere Kurve). Weitere Daten wie Abb. 36

III) Die Bindung von Cu(II) an ein Membranprotein

A) Die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung

In einer vorhergehenden Studie (Vierke und Struckmeier 1978) war gezeigt worden, daß die Konzentrations- und pH-Wert-Abhängigkeit der Lumineszenzlöschung erklärt werden kann mit der inaktivierenden Bindung eines Cu(II)-Ions an ein Membranprotein:



Für den allgemeinsten Fall gilt, daß die Bindung unspezifisch ist, d.h. es existieren nicht identische Bindungsstellen, die sich gegenseitig nicht beeinflussen.

Die Bindung von n Cu(II)-Ionen an identische, sich nicht beeinflussende Bindungszentren verursache die vollständige Inhibierung des Proteins ;
dann kann aus der Definition der Bindungskonstanten der Zentren, deren Konzentration $[F]$ bezeichnet:

$$K_M = \frac{[FCu]}{[F][Cu_{\text{frei}}]}$$

sowie dem Massenerhaltungsgesetz:

$$[F_0] = [F] + [FCu] \quad \text{und} \quad [FCu] = [Cu_{\text{gebunden}}]$$

nach der Substitution:

$$n \cdot [P_0] = [F_0]$$

folgende Gleichung gewonnen werden (Bisswanger 1979, Klotz 1953) :

$$\frac{[P_0]}{[Cu_{\text{geb}}]} = \frac{1}{n} + \frac{1}{n \cdot K_M [Cu_{\text{frei}}]}$$

wobei $[P_0]$ die Konzentration des Membranproteins, n die Anzahl der Bindungsstellen und K_M die Bindungskonstante für eine einzelne Cu(II)-Bindungsstelle darstellt.

Es ist denkbar, daß ein funktionelles Protein der Elektronentransportkette eine größere Anzahl n von Cu(II)-Ionen bindet und je nach gebundener Zahl graduell in seiner

Funktion beeinträchtigt wird. Gegen dieses Modell spricht das Ergebnis der Untersuchung der Abklingkurven der Lumineszenz. Diese legen ein Modell nahe, das nur zwei Zustände von PSII nach der Cu(II)-Inkubation kennt:

Entweder ist es inhibiert, entwickelt keinen Sauerstoff mehr, oder es ist völlig intakt.

Ein derartiges Modell ist aber mit der Annahme einer unspezifischen Inhibierung nicht vereinbar. Auch $n=2$ oder 3 müßte sich darin ausdrücken, daß Zwischenzustände verminderter Aktivität existieren. Daher gilt als hinreichend nachgewiesen, daß die Bindung eines einzigen Cu(II)-Ions zur Inhibierung ausreicht.

Für $n=1$ ergibt sich folgender Zusammenhang mit der Sauerstoffentwicklung:

(Es wird nicht angenommen, daß das Protein nur ein Cu(II)-Ion binden kann, sondern, daß die Bindung von einem Cu(II)-Ion an eine spezifische Stelle die Inhibierung hervorruft) Die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung v ist proportional zur Konzentration intakter Enzym-systeme. Als Inhibierung wird

$$I = 1 - \frac{v}{v_0} \quad \text{definiert.}$$

Diese Größe gibt dann den Bruchteil inaktivierter Enzymsysteme nach der Cu(II)-Inhibierung an.

Unter der Annahme, daß ein Enzymsystem nach der Bindung eines Cu(II)-Ions an eines seiner Bestandteile keinen Sauerstoff mehr entwickelt, gilt

$$1 - \frac{v}{v_0} = \frac{[PCu]}{[P_0]} = \frac{[Cu_{geb}]}{[P_0]} \quad (2)$$

und die Gleichung

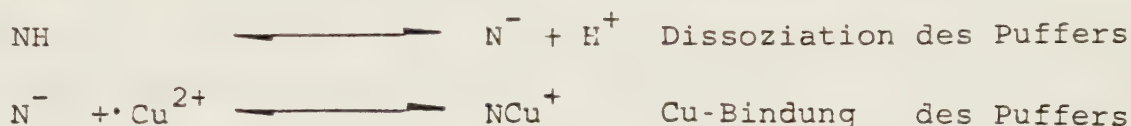
$$1 - \frac{v}{v_0} = \frac{K_M \cdot [Cu_{frei}]}{1 + K_M [Cu_{frei}]} \quad (3)$$

stellt die Bindungsfunktion der Cu(II)-Ionen an das funktionelle Protein dar. Die Meßdaten lassen sich mit Gleichung (3) gut in Übereinstimmung bringen.

B) Die Bestimmung der Bindungsdaten

Es wurde in vorausgegangenen Experimenten (Vierke und Struckmeier 1978) gezeigt, daß die Cu-Bindungskonstante des Proteins pH-abhängig ist. Dies erlaubt den Schluß, daß ein dissoziiertes Membranprotein Cu(II) bindet.

Im vorliegenden System wurde ein Puffer verwendet, der Cu(II) leicht komplexiert. Dies ist in die Berechnungen einzubeziehen: Folgende Gleichgewichte tauchen auf:



K_a und K_T , die Dissoziations- und Metallbindungskonstante des Puffers sind bekannt. Die Konzentration an freiem Cu(II) läßt sich dann berechnen nach:

$$[\text{Cu}_{\text{frei}}] = [\text{Cu}_{\text{total}}] \cdot \frac{[\text{H}^+] + K_a}{[\text{H}^+] + K_a (1 + K_T [\text{N}])} \quad (4)$$

wobei $[\text{N}]$ die Konzentration des Puffers bezeichnet.

Berücksichtigt man, daß nur das dissoziierte Protein Cu(II) bindet



so gelten die Gleichgewichtsbedingungen

$$K_M = \frac{[\text{PCu}]}{[\text{P}^-] [\text{Cu}]}$$

wobei K_m die Metallbindungskonstante bezeichnet,

$$K_P = \frac{[\text{P}^-] [\text{H}^+]}{[\text{PH}]}$$

wobei K_P die Dissoziationskonstante der bindenden Gruppe des Proteins darstellt.

Kombination dieser Gleichungen unter Berücksichtigung der Massenerhaltung ergibt

$$\frac{[\text{P}_0]}{[\text{PCu}]} = 1 + \frac{1}{K_M \cdot [\text{Cu}_{\text{frei}}]} \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_P} \right) \quad (5)$$

wobei die freie Cu(II)-Konzentration nach Gleichung (4) berechnet werden muß. K_p stellt die Dissoziationskonstante der bindenden Gruppe des Proteins dar.

Dann gilt nach Gleichung (3) (4) und (5):

$$(6) \quad \frac{v_o}{v_o - v} = 1 + \frac{[H^+] + K_a}{[H^+] + K_a} \frac{(1 + K_T[N])}{1 + \frac{[H^+]}{K_p}} \cdot \frac{1}{K_M Cu_{total}}$$

Aufgrund dieser Ableitung kann ein Diagramm

$\frac{v_o}{v_o - v}$ versus $\frac{1}{[Cu_{total}]}$ interpretiert werden

als Hughes-Klotz-Diagramm der Konzentration an freiem und gebundenem Cu(II) (Klotz 1953). Als Cu-Konzentration kann die Konzentration im Puffer angenommen werden, da die Membranen nur sehr wenig Cu binden bzw. reduzieren (Tab.77-80). Allerdings wird das Hughes-Klotz-Diagramm aus diesem Grund bei geringen Cu-Konzentrationen ungenau. Die Daten für das doppelt reziproke Diagramm sind Abb. 40 entnommen. Sie stellen die Endpunkte der Kinetiken dar. Jede Meßreihe bei bestimmter Cu-Konzentration ist mit einer neuen Präparation von Chloroplasten durchgeführt worden. Daher ist eine Streuung von $\pm 10^0\%$ zu beobachten. Diese Fehlergrenzen sind in Abb. 43 eingezeichnet. Im Hughes-Klotz-Diagramm (Abb.43) läßt sich der Schnittpunkt der Geraden mit der x-Achse bestimmen. Er gibt die scheinbare Stabilitätskonstante K'_M an

$$K_M = K'_M \left(1 + \frac{[H^+]}{K_p} \right) \left(\frac{[H^+] + K_a}{[H^+] + K_a} \frac{(1 + K_T[N])}{1 + \frac{[H^+]}{K_p}} \right) \quad (7)$$

Sie enthält noch den pH - abhängigen Dissoziationsgrad des Proteins. In der oben zitierten Studie (Vierke und Struckmeier, 1978) war gezeigt worden, daß K'_M mit dem pH-Wert variiert. Aus den dort vorgestellten Daten läßt sich der pK_p -Wert der bindenden Gruppe bestimmen (siehe nächstes Kapitel)

$$pK_p = 6,4 \pm 0,3$$

Das bedeutet, daß das Protein bei dem in diesen Experimenten verwendeten pH-Wert des Puffers von 7,9 praktisch völlig dissoziiert ist.

Mit diesem Ergebnis für die Dissoziationskonstante vereinfacht sich Gleichung (6) zu

$$\frac{1}{I} = 1,0 + \frac{1}{K_M} \left(\frac{[H^+] + K_a (1 + K_T [N])}{[H^+] + K_a} \right) \frac{1}{[Cu_{total}]} \quad (8)$$

Die Klammer in Gleichung (8) drückt die pH-Abhängigkeit der freien Cu(II)-Konzentration im Puffer aus.

Nach Good et al. (1966) gilt für den verwendeten Tes-

Puffer: $pK_a = 7,5$, $pK_T = 3,2$. Da bei einem pH-Wert von 7,9 und einer Pufferkonzentration von 0,05 M/L gemessen wurde, kann ein Wert von 57,8 für die Klammer berechnet werden. Mit Gleichung (8) kann dann die Stabilitätskonstante des Cu-Protein-Komplexes bestimmt werden:

$$\log K_M = 5,25 \pm 0,05$$

Dies entspricht einer freien Reaktionsenthalpie $-\Delta G$ von:

$$-\Delta G = R \cdot T \cdot \ln K_M$$

$$-\Delta G = 30 \pm 0,4 \text{ KJ/M}$$

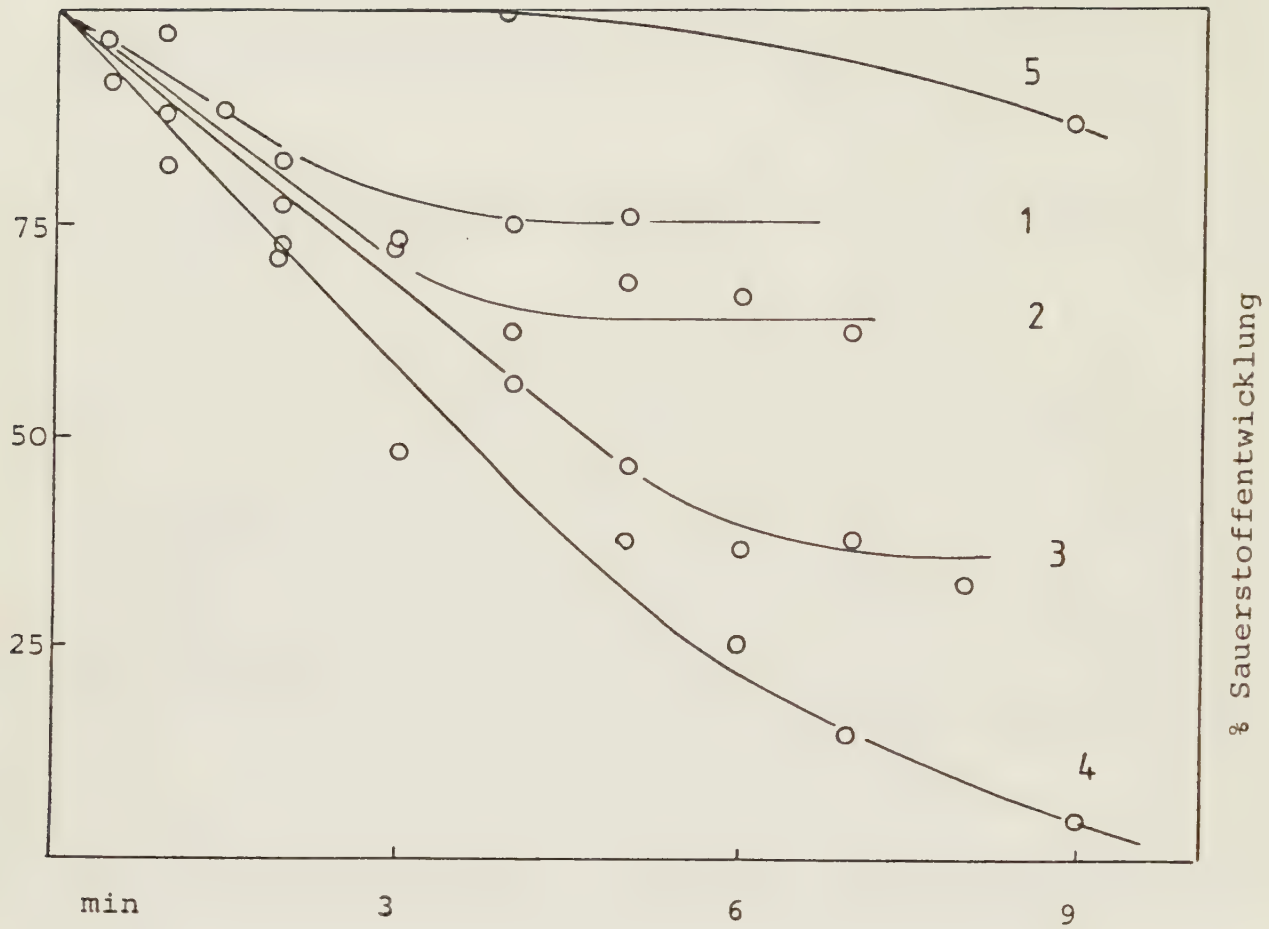


Abb. 40

Die Kinetik der Cu(II)-Inhibierung

Nach der entsprechenden Zeit der Cu(II)-Einwirkung im Licht wurde Simo und DCMU zugegeben und die O_2 -Entwicklung gemessen. Standardbedingungen. $CuSO_4$ -Konzentrationen:

1: 0,015 mM/L; 2: 0,050 mM/L; 3: 0,075 mM/L; 4: 0,100 mM/L
0,4 mg/ml Simo; 4 μ M/L DCMU.

Kurve 5: endogene Cu(II)-Konzentration ohne weiteren Zusatz

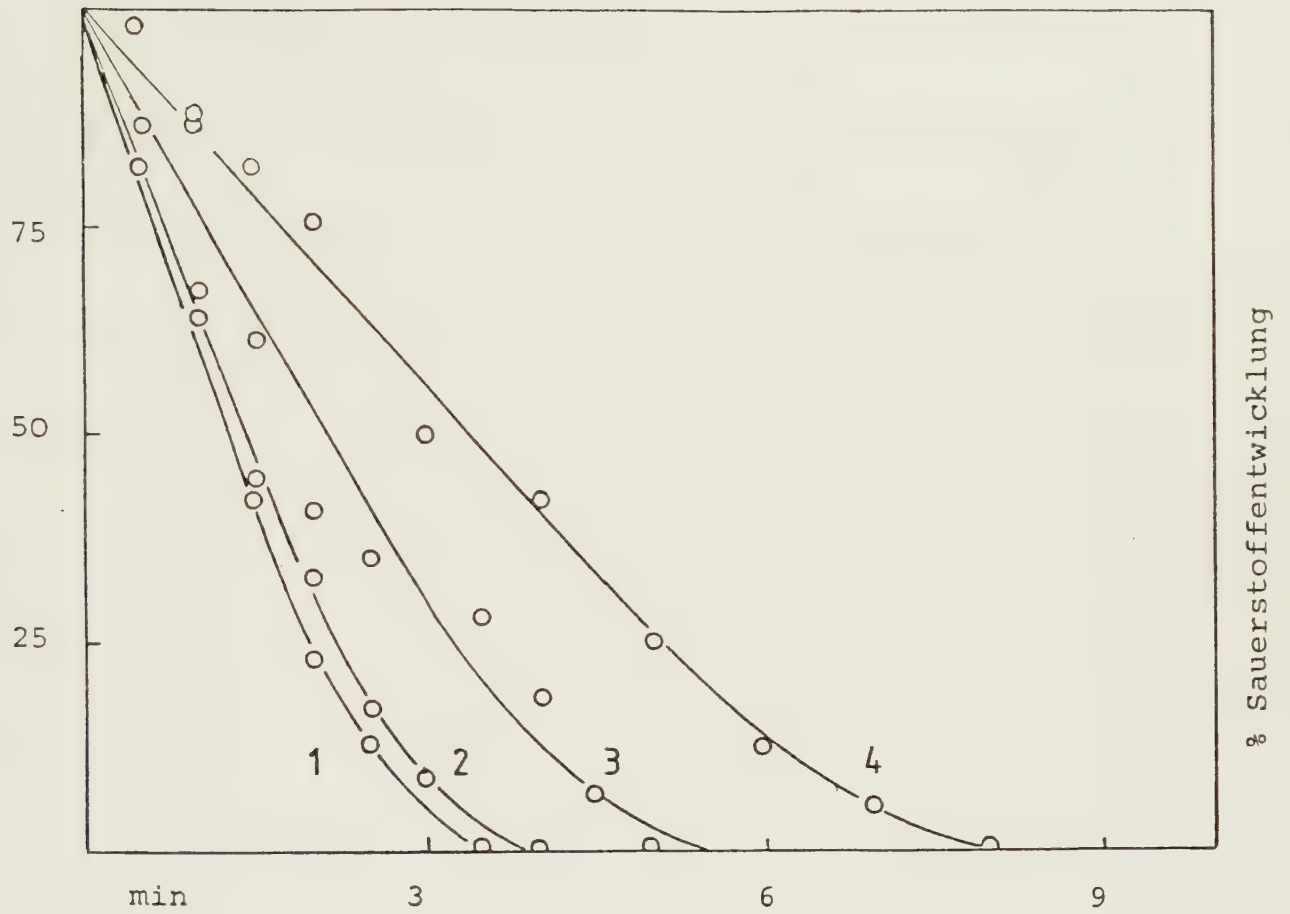


Abb. 41

Die Kinetik der Cu(II) -Inhibierung

Legende wie in Abb. 40

CuSO_4 -Konzentrationen: 1: 0,15 mM/L; 2: 0,20 mM/L; 3: 0,25 mM/L;
4: 0,5 mM/L

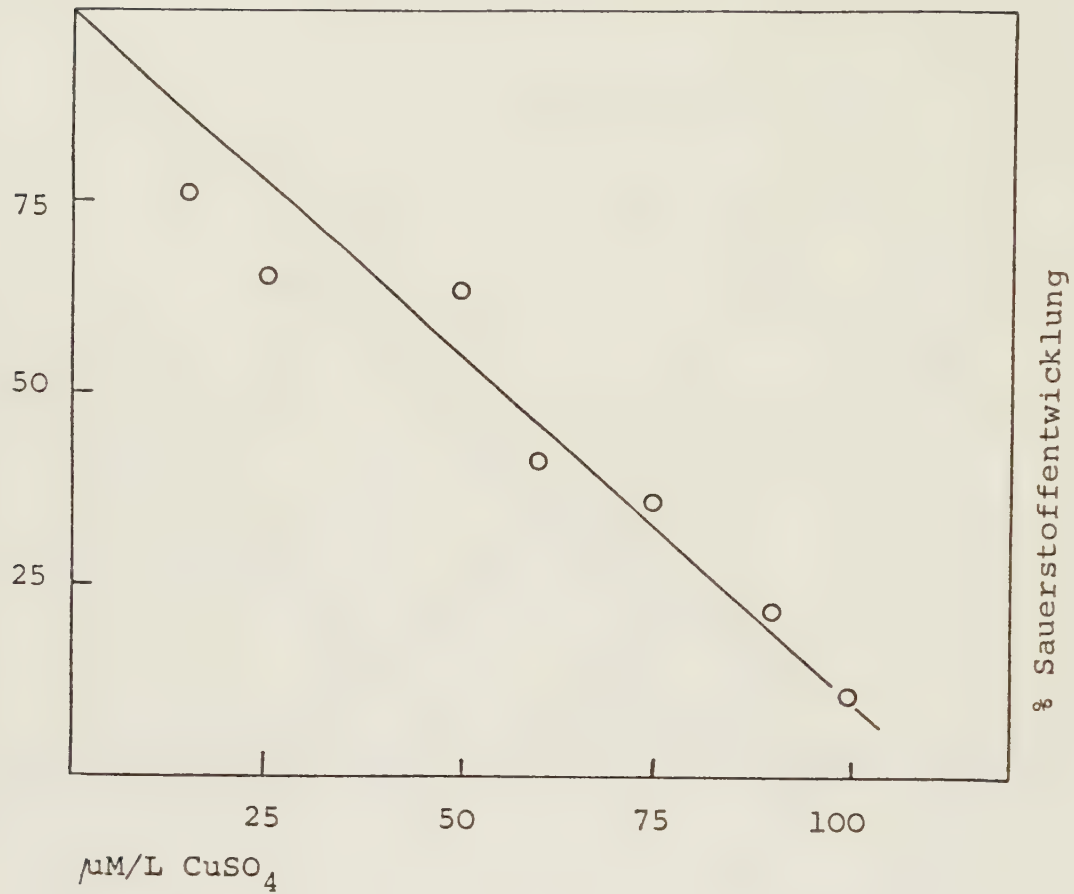


Abb. 42

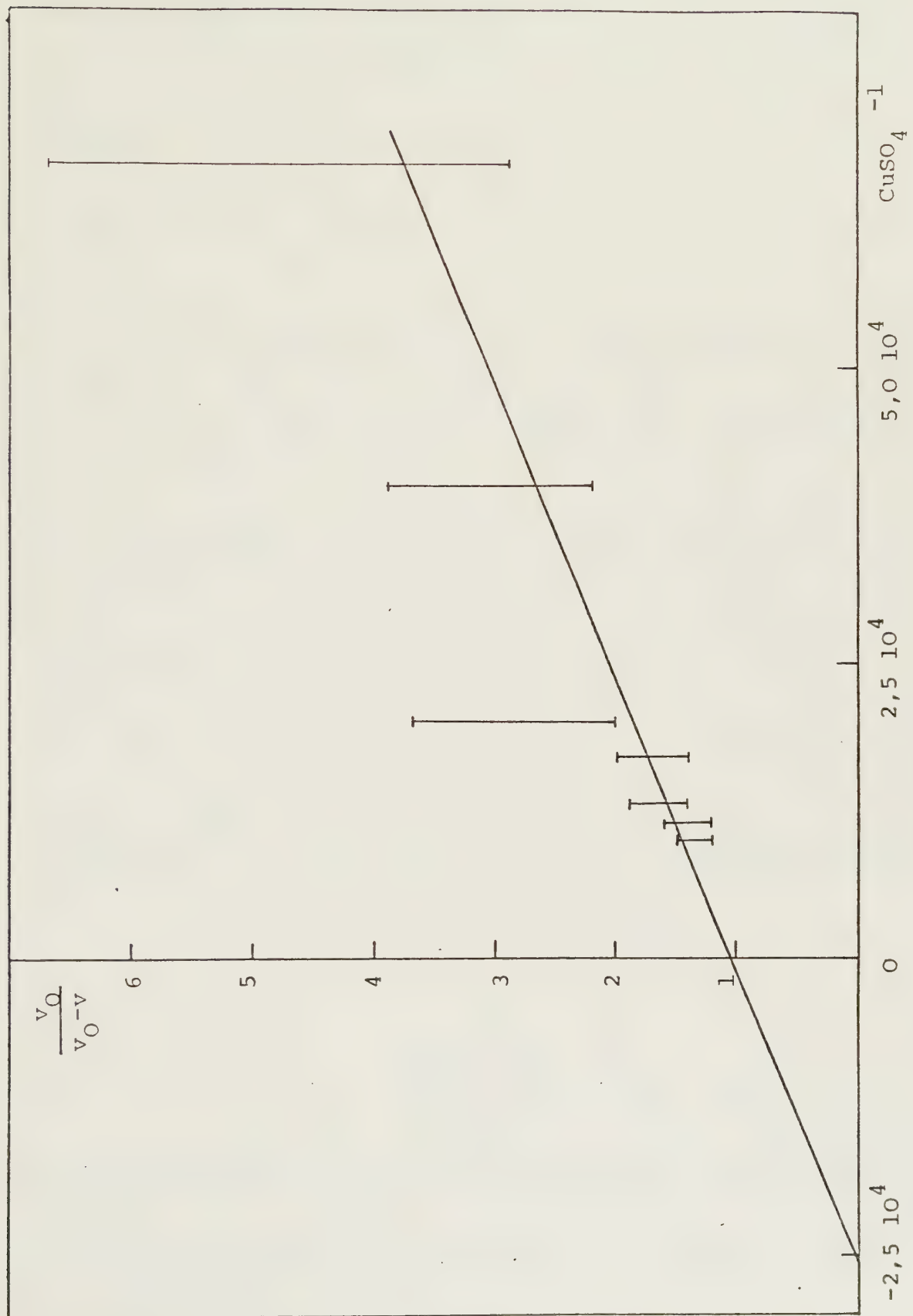
Endwerte der Cu(II)-Inhibierung der Sauerstoffentwicklung

Akzeptor: 0,4 mg/ml Simo, 4 $\mu\text{M/L}$ DCMU, Standardbedingungen.

Daten teilweise aus Abb. 40 + 41

Doppelt-reziprokes Diagramm der Cu(II)-Inhibierung der
Sauerstoffentwicklung

Daten aus Abb. 40 + 41



C) Die Lumineszenzlöschung

Die vorausgegangenen Ergebnisse lassen sich mit den Werten überprüfen, die aus den Lumineszenzmessungen abgeleitet werden können (Vierke und Struckmeier 1978) :

Analog Gleichung (5) gilt für die Löschung der Lumineszenz :

$$\left(1 - \frac{L}{L_0}\right)^{-1} = 1 + \frac{1}{K_M [Cu_{\text{frei}}]} \left(1 + \frac{[H^+]}{K_P}\right) \quad (10)$$

Abb. 45 zeigt die Meßwerte. Die Geradenschar schneidet die $(1 - L/L_0)^{-1}$ - Achse nicht bei 1,0, sondern bei 0,8. Diese Abweichung kann daran liegen, daß die Konzentration an freiem Cu(II) im Puffer nicht exakt linear von der Gesamtkonzentration von Cu(II) abhängt.

Aus diesem Diagramm wurden die relativen Bindungskonstanten bestimmt (Abb.44). Ihre pH-Abhängigkeit wird durch zwei Faktoren bestimmt:

- Die Dissoziationskonstante der bindenden Gruppe: K_P
- Die pH-Abhängigkeit der Konzentration an freiem Cu(II)-im Puffer

Nach Berecki-Biedermann (1956) kann die Hydrolyse von Cu(II)-Ionen in alkalischen Medien bestimmt werden unter Annahme der Gleichgewichte:



$$\text{mit } pK = 10,6 \pm 0,1$$



$$\text{mit } pK = 8,0 \pm 0,1$$

Die Konzentration an freien Cu(II)-Ionen im Phosphat-Puffer wurde bei pH 6,0 und 6,5 gemessen (Abb.46).

Die Meßdaten lassen sich mit diesen Gleichgewichten nicht exakt approximieren, sie liegen unter den theoretischen Werten.

Es wurde versucht, unter Annahme einer zusätzlichen Verbindung Übereinstimmung zu erreichen:



Aber auch mit dieser Annahme läßt sich die pH-Abhängigkeit der Konzentration an freiem Cu(II) im Puffer nicht exakt beschreiben.

Dies kann an der Bildung von Cu-Phosphat-Komplexen liegen, die durch diesen Ansatz nicht erfaßt werden.

Daher wurde die freie Cu(II)-Konzentration für die Meßwerte bei pH 6,0 und 6,5 aus den experimentellen Werten bestimmt.

Für die Bindungskonstante gilt nach Gleichung (10) :

$$K_M = K'_M \cdot \left(1 + \frac{[\text{H}^+]}{K_P} \right) \quad (11)$$

(K'_M wird graphisch aus dem Schnittpunkt der Geraden mit der $[\text{Cu}]^{-1}$ - Achse bestimmt: $K'_M = -[\text{Cu}_{\text{frei}}]^{-1}$)

Da dies unabhängig vom pH - Wert gelten muß, also bei zwei verschiedenen pH - Werten $K_M^1 = K_M^2$ sein muß, gilt:

$$K_M^{1'} \cdot \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_1}{K_P} \right) = K_M^{2'} \cdot \left(1 + \frac{[\text{H}^+]_2}{K_P} \right)$$

Daraus läßt sich durch Umformen für die Dissoziationskonstante K_P ableiten:

$$K_P = \frac{[\text{H}^+]_1 - [\text{H}^+]_2 A}{A - 1} \quad (11a)$$

Wobei
$$A = \frac{[\text{Cu}_{\text{frei}}]_1}{[\text{Cu}_{\text{frei}}]_2} = \frac{K_M^{2'}}{K_M^{1'}}$$

Es ergibt sich bezogen auf die totale Cu(II)-Konzentration im Puffer :

$$(K_M^{2'})^{-1} = 4,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M/L} \quad \text{für pH} = 6,0$$

$$(K_M^{1'})^{-1} = 7,2 \pm 0,5 \cdot 10^{-4} \text{ M/L} \quad \text{für pH} = 6,5$$

Die Konzentration an freiem Cu(II) bei diesen Werten kann experimentell bestimmt werden (Abb.46). Die Konzentration an durch die Membranen gebundenem Cu(II) kann vernachlässigt werden, da sie unter 5% liegt.

Es ergibt sich bezogen auf die Konzentration an freiem Cu(II) im Puffer:

$$(K_M^{1'})^{-1} = 1,0 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ M/L für pH } 6,0$$

$$(K_M^{2'})^{-1} = 0,8 \pm 0,3 \cdot 10^{-4} \text{ M/L für pH } 6,5$$

Zur Bestimmung von K_p wurde die Konzentration an freiem Cu(II) im Puffer mit Hilfe des ESR-Signals des Cu(II)-Hexaquo-Ions bestimmt. Die relativen Werte für die Schnittpunkte der Geraden des Hughes-Klotz-Diagramm (Abb.45) mit der $(\text{Cu})^{-1}$ - Achse sind in Abb. 46 b dargestellt. Diese Konzentrationen liegen an der Grenze der Nachweisempfindlichkeit und sind daher nur mit großem relativem Fehler bestimmbar. Da die Höhe des ESR-Signals proportional zur Konzentration an freiem Cu(II) ist, läßt sich aus diesen Werten nach Gleichung 11a die Dissoziationskonstante pK_p bestimmen. Es ergibt sich:

$$pK_p = 6,4 \pm 0,3$$

Nach Gleichung (10) läßt sich aus den Daten der Lumineszenzmessungen auch die Stabilitätskonstante des Cu - Protein-komplexes bestimmen. Mit

$$\begin{aligned} \log K_M &= 4,7 \pm 0,5 \text{ M/L}^{-1} \\ \text{und} \\ -\Delta G &= 26,9 \pm 2,9 \text{ KJ/M} \end{aligned}$$

stimmen die aus der Inhibierung der Lumineszenz gewonnenen Werte innerhalb der Fehlergrenzen mit denen überein, die aus der Inhibierung der Sauerstoffentwicklung berechnet wurden.

Vergleichswerte für die Konstanten sind in Tab. 1-3 zusammengefaßt.

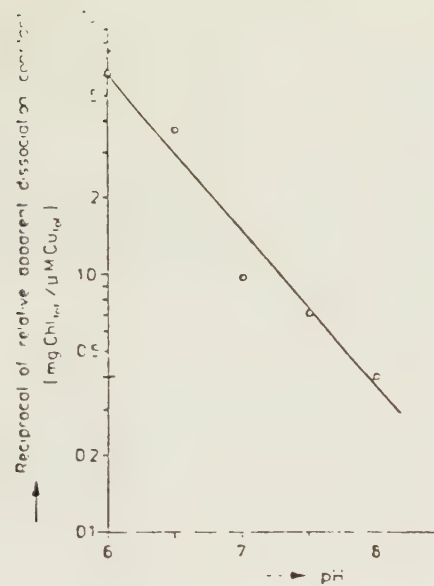


Abb. 44

pH-Abhängigkeit der relativen Bindungskonstante K_M' der Cu(II)-bindenden Gruppe (Vierke und Struckmeier 1978)

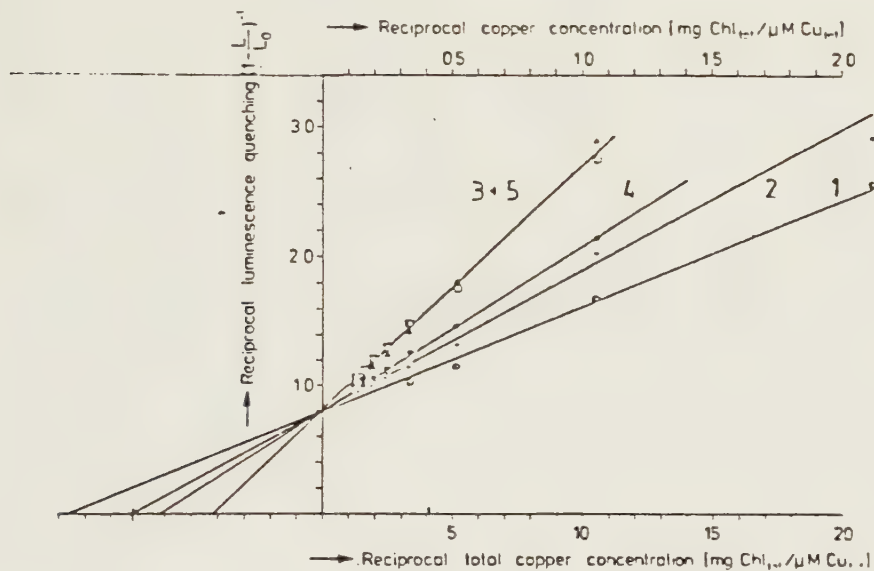


Abb. 45

Hughes-Klotz-Diagramm der Konzentration des freien und gebundenen Cu(II). Die Konzentration des gebundenen Cu(II) wird ausgedrückt durch die relative Lumineszenzlösung $1-L/L_0$. Die obere Skala ist gültig für pH = 7 (1), = 7,5 (2), = 8 (3), die untere für pH = 6 (4) und 6,5 (5). (Vierke und Struckmeier 1978)

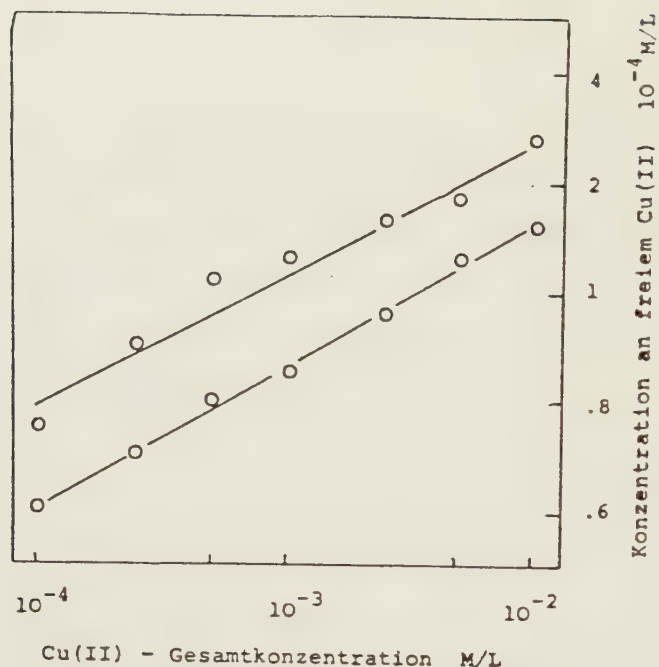


Abb. 46 a

Konzentration an freiem
Cu(II) im Phosphatpuffer
Daten aus Struckmeier (1976)

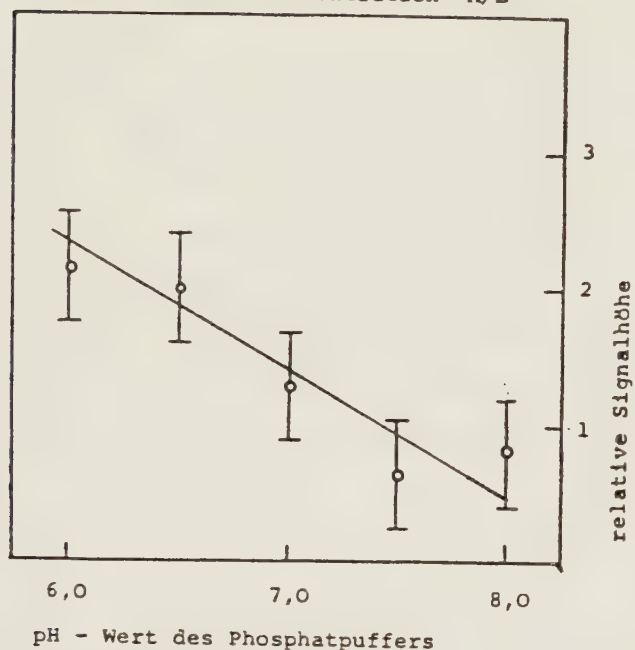


Abb. 46 b

ESR-Signalthöhe des Cu(II)-
Hexaquo-Ions im Phosphat-
puffer. Die gesamte Cu(II)-
konzentration beim jeweiligen
pH-Wert entspricht dem Schnitt-
punkt der Geraden mit der
 Cu^{-1} -Achse in Abb. 45 : (mM/L)
pH 6,0 - 0,42; pH 6,5 - 0,72;
pH 7,0 - 3,33; pH 7,5 - 4,76;
pH 8,0 - 8,33.

Tabelle 1

Stabilitätskonstanten von Cu(II)-Komplexen

nach Sundberg und Martin (1974), Vallee und Wacker (1970)

Ligand	$\log K_L$
Histamin	9,6
Histidin	10,1
Imidazol	4,2
NH_3	4,2
Pyridin	2,4
EDTA	18,7
8-Hydroxichinolin	12,6
Oxalsäure	6,2

Tabelle 2

Relative Affinität von Proteinen für Cu(II)-Ionen

nach I. Klotz (1953), Vallee, Wacker (1970)

	- ΔG	KJ/M
Karboxypeptidase		59,6
α -Casein		30,7
β -Casein		30,1
Serum Albumin		27,3
β -Lactoglobulin		24,4
Lysozym		18,4

Messungen bei 0°C, pH 6,5 , 0,2M-Azetat-Lösung

Tabelle 3

Vergleichswerte von Dissoziationskonstantennach I. Klotz (1953), Data for Biochemical Research (1969),
Vallee, Wacker (1970)

Gruppe	pK_a			
	Proteine	Histidin	Gluthathion	Cystein
Karboxyl-	1,0-7,3	1,8	2,1 3,6	1,9
Imidazol-	5,5-7,4	6,0	-	-
α -Amino-	7,8-8,3	9,3	8,8	8,4
ϵ -Amino-	9,6-9,8	-	-	-
-SH-	9,0-9,8	-	9,7	10,5

D) Die Cu(II)-bindende Gruppe

Die vorangegangenen Berechnungen ermöglichen einige Schlußfolgerungen:

Nachdem schon die Inhibierung der Lumineszenz sich deuten ließ als inaktivierende Bindung eines Cu(II)-Ions an ein Membranprotein, konnte jetzt gezeigt werden, daß sich auch die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung derart deuten läßt.

Die Stabilitätskonstante dieses Cu-Proteinkomplexes wurde mit zwei völlig verschiedenen Methoden in zwei verschiedenen Puffern mit unterschiedlichen Cu(II)-Komplexierungseigenschaften gemessen. Die Messungen der Lumineszenzlöschung wurde im Phosphatpuffer durchgeführt, die der Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung in TES-Puffer. Trotzdem unterscheiden sich die berechneten Werte nur geringfügig.

Das ist ein sehr guter Hinweis darauf, daß die Inhibierung tatsächlich auf eine derartige Komplexbildung zurückzuführen ist, und daß in beiden Fällen die Bindung von Cu(II) an dasselbe Protein gemessen wurde.

Die inhibierende Wirkung von Hg, Cd, Zn, Ag und Cu auf Enzyme ist oft ihrer Wechselwirkung mit SH-Gruppen zugeschrieben worden. Zwar können viele Gruppen mit Schwermetallionen reagieren, einschließlich Amino-, Imidazol- und Karboxylgruppen, doch ist die Affinität dieser Gruppen relativ gering verglichen mit der der Sulfhydrylgruppen. Die Stabilitätskonstanten derartiger Komplexe mit Cu^{2+} und Cu^+ liegen in der Größenordnung von 10^{19} - 10^{20} , während die anderen Gruppen Cu(II) mit Stabilitätskonstanten von 10^2 - 10^8 binden. (Vallee, Wacker 1970, Hochster, Quastel 1963). Daher reagieren Cu(II)-Ionen zuerst mit jeder verfügbaren SH-Gruppe. Erst wenn diese Gruppen gesättigt sind, beginnen andere Gruppen mit Cu(II) zu reagieren, Cedeno-Maldonado et al. (1972) nahmen an, daß die Inhibierung des photosynthetischen Elektronentransportes zurückzuführen sei auf die Reaktion von Cu-Ionen mit Sulfhydryl-Gruppen. Zur Klärung dieser Frage wurden folgende Versuche unternommen: Die durch Bindung an SH-Gruppen hervorgerufene Inhibierung

an Enzymen ist meist reversibel und kann dann durch Zugabe von Mono- oder Dithiolen aufgehoben werden (Hochster, Quastel 1963). Chloroplasten wurden mit $0,5 \text{ mM/L CuSO}_4$ in der üblichen Weise lichtinhibiert. Danach wurde 10 min lang 1 mM/L 2,3-Dimercaptopropanol, Dithiothreitol oder 2-Merkaptoäthanol unter gleichzeitiger Belichtung einwirken lassen. Keines dieser Verfahren hatte einen Einfluß auf die Inhibierung.

Trotzdem können mit diesem Experiment allein SH-Gruppen als Liganden nicht ausgeschlossen werden. Allerdings ist die Interpretation von Cedeno-Maldondo et al. nicht konsistent mit den für das bindende Protein berechneten Daten:

Die bindende Gruppe dissoziiert mit einem $\text{pK}_a \leq 6,8$.

Von einer Sulfhydrylgruppe wäre ein pK_a von 9-10 zu erwarten.

Die Stabilitätskonstante des Cu-Komplexes beträgt 5,3.

Dieser Wert ist viel zu niedrig, er müßte für SH-Gruppen zwischen 19 und 20 liegen.

Die Bildung von Cu(II)- Merkaptid-Komplexen als Ursache der Inhibierung kann daher ausgeschlossen werden.

IV) Die Kinetik der Inhibierung

A) Diffusionsgekoppelte Bindung von Cu(II)

Die Abb. 40 u.41 zeigen den zeitlichen Verlauf der Inhibierung der Sauerstoffentwicklung unter kontinuierlicher Beleuchtung mit weißem Licht und maximaler Intensität.

Die Inhibierungskinetik nicht entkoppelter Chloroplasten mit Fecy als Akzeptor zeigt eine Verzögerungsphase von mehreren Minuten und anschließend eine Kinetik nullter Ordnung. Als Ursache dafür ist anzunehmen, daß Cu(II) wie die Schwermetallionen Hg(II) und Cd(II) entkoppelnd wirkt (Izawa und Good 1969, Vallejos, Andreo 1976), was anfangs zu einer Steigerung der Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung führt. Inhibierung und Entkopplung, beides durch CuSO₄ wirken hier entgegengesetzt. Entkoppelte Chloroplasten zeigen diese Verzögerungsphase nicht (Abb.47 u.48).

Wird Silicomolybdat in Kombination mit DCMU als Akzeptor benutzt, so ist auch bei nicht entkoppelten Chloroplasten keine Verzögerungsphase zu beobachten. Dies liegt daran, daß Silicomolybdat seinerseits entkoppelnd wirkt (Giaquinta et al. 1974,1975). Entsprechend ist diese Kinetik ebenfalls quasilinear und eine zusätzliche Entkopplung bewirkt nur eine geringfügige Beschleunigung. Abb.40+41 zeigen die Abhängigkeit der Inhibierungsgeschwindigkeit von der Cu(II)-Konzentration. Diese Kinetiken verlaufen zunächst nach nullter Ordnung und erreichen erst bei ca. 90 % eine Sättigung.

Der Bindung von Cu(II)-Ionen an ein Membranprotein gemäß Gleichung (0,1) entspräche einer Kinetik zweiter Ordnung:

$$-\frac{dP}{dt} = k_1 \cdot P \cdot Cu - k_2 \cdot PCu$$

(Daß nur dissoziierte Proteine Cu(II) binden, kann in der weiteren Betrachtung vernachlässigt werden, da sie bei pH 7,9 fast völlig dissoziiert sind.)

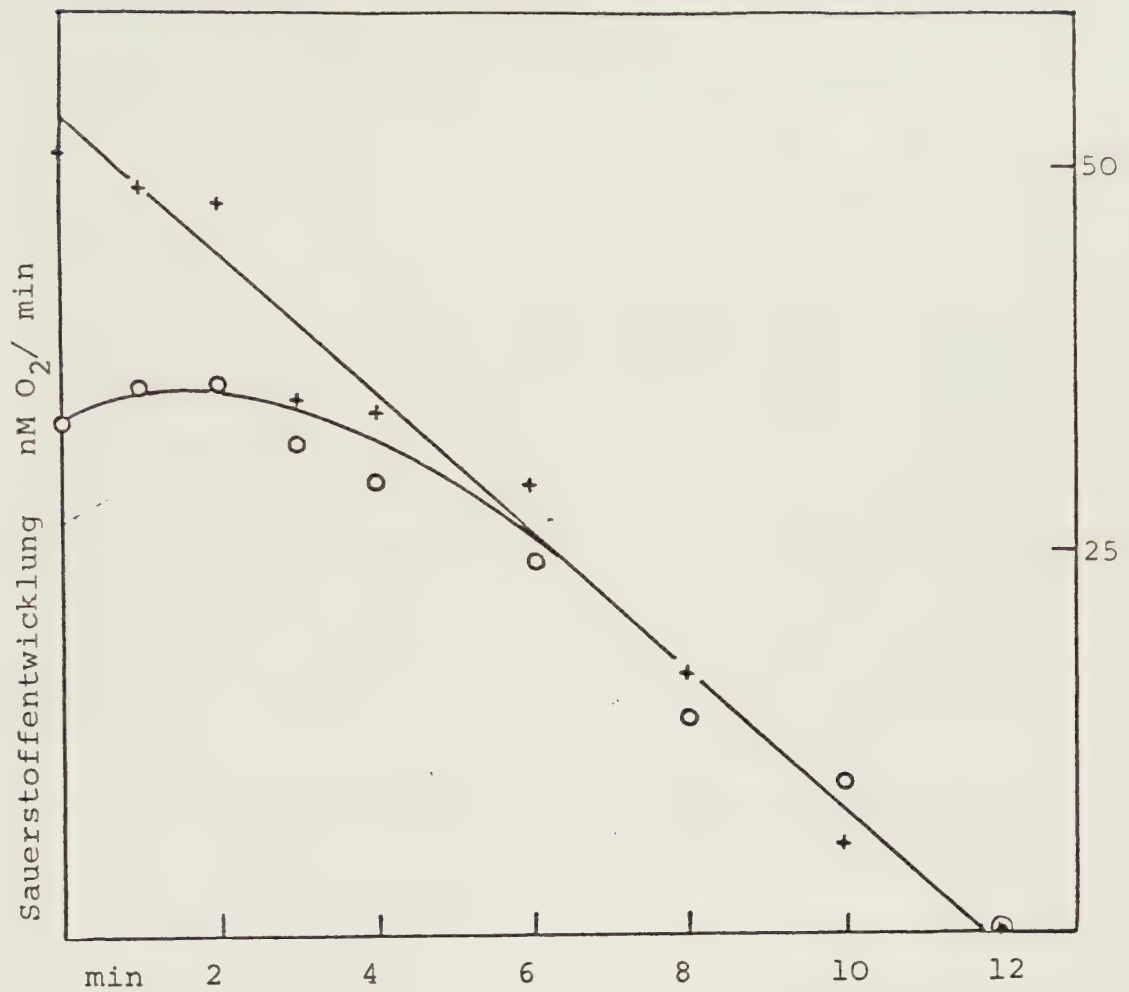


Abb. 47

Kinetik der Inhibierung der Sauerstoffentwicklung
durch Cu

o o o nicht entkoppelte Chloroplasten

+ + + mit 2.5 mM/L NH₄Cl entkoppelte Chloroplasten

Chloroplasten wurden bei 200 μM/L CuSO₄ lichtinkubiert.
Als Akzeptor wurde 2.5 mM/L Fecy benutzt.

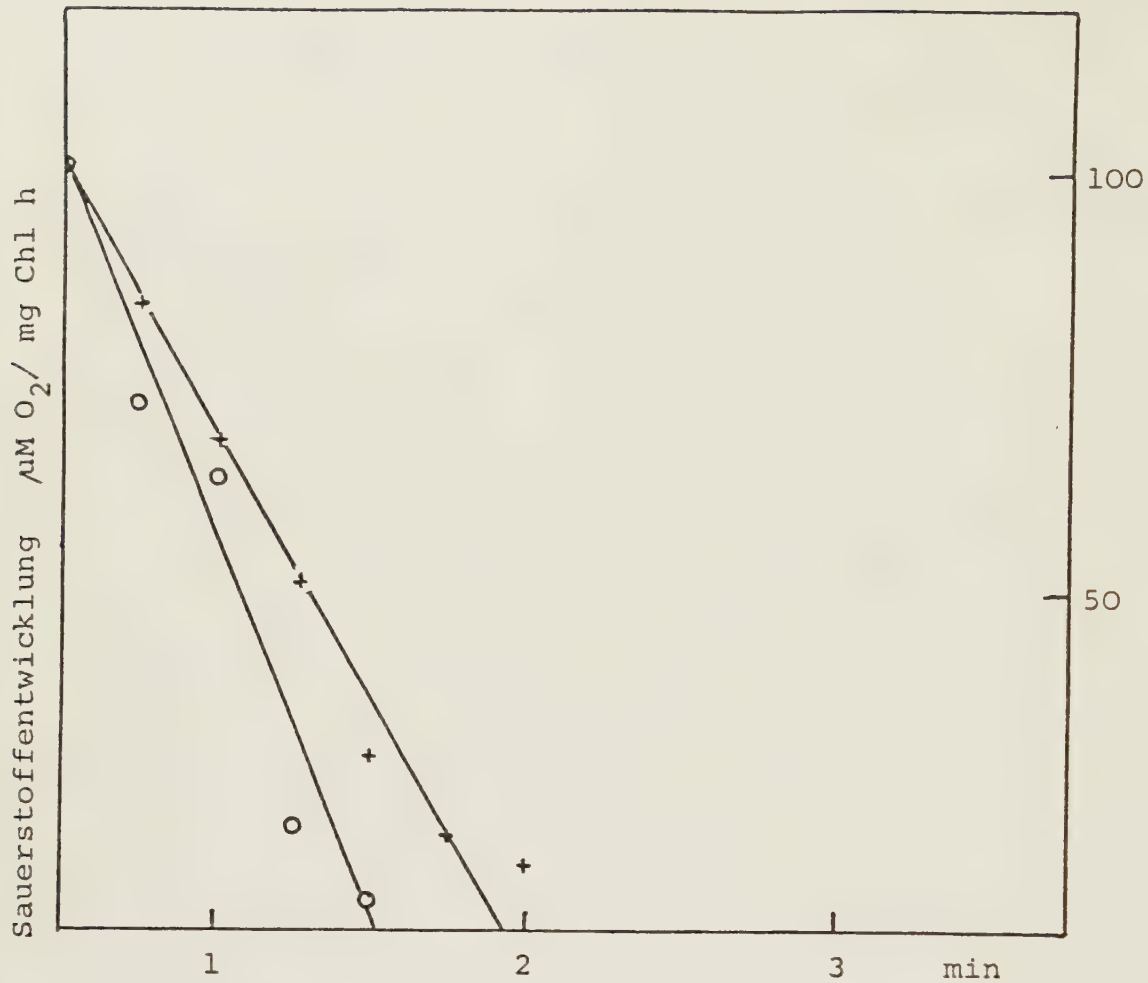


Abb. 48

Kinetik der Inhibierung der Sauerstoffentwicklung
durch Cu

+ + + nicht entkoppelte Chloroplasten

o o o mit 2.5 mM/L NH_4Cl entkoppelte Chloroplasten

Chloroplasten wurden bei 500 $\mu\text{M/L}$ CuSO_4 lichtinkubiert.
Als Akzeptor wurde 200 $\mu\text{M/L}$ Simo in der Gegenwart von
4 $\mu\text{M/L}$ DCMU benutzt.

Die Bindungsdaten zeigen, (Tab.80), daß nur ein kleiner Bruchteil der zur Inhibierung zugegebenen Cu(II)-Ionen gebunden wird. Daher ist zu erwarten, daß die Cu(II)-Konzentration während des Inhibierungsprozesses annähernd konstant bleibt. Demnach wäre eine Anfangskinetik erster Ordnung zu erwarten, die Geschwindigkeitsgleichung müßte in integrierter Form lauten:

$$\ln \frac{P}{P_0} = -k_1 \cdot Cu \cdot t$$

Aber auch dieser Reaktionsmechanismus liegt nicht vor. Streng genommen gilt eine derartige Geschwindigkeitsgleichung auch nur für Reaktionen in Gasen oder verdünnten Lösungen. Im vorliegenden Fall haben wir es jedoch mit einem Protein zu tun, das mindestens zum Teil in die Lipidschicht eingebettet ist, und dessen Beweglichkeit stark eingeschränkt ist. Daher müssen die Geschwindigkeitsgleichungen bestimmt werden unter der Annahme, daß die Cu(II)-Ionen eine Diffusionsbarriere zu überwinden haben, bevor sie mit dem Protein reagieren. Diese Annahme scheint aus zwei Gründen notwendig:

Nach Trebst (1974) befindet sich die Komponente, die durch Cu(II) inhibiert wird, in der lipophilen Region der Membran.

Das vom Reaktionszentrum von Photosystem II erzeugte elektrische Feld stellt eine Potentialbarriere dar, durch die die Cu(II)-Ionen diffundieren müssen.

Demnach muß die Geschwindigkeitsgleichung Diffusion und chemische Reaktion berücksichtigen.

Dieses Problem kann vom Diffusionsstandpunkt betrachtet werden: Ein Teil der diffundierenden Spezies wird im Verlauf der Diffusion immobilisiert. Dieser Fall wird nach der klassischen Diffusionstheorie beschrieben durch die Differentialgleichung (Crank 1975) :

$$\frac{C}{t} = D \operatorname{divgrad} C - \frac{S}{t}$$

wobei S die immobilisierte Substanz C bezeichnet, C die diffundierende Substanz C und D den Diffusionskoeffizienten.

Vom chemischen Standpunkt bedeutet dieses Problem: Die Geschwindigkeit der chemischen Reaktion ist abhängig von der Nachlieferung der reagierenden Substanz.

Diese Differentialgleichung ist nicht-linear und läßt sich nur mit numerischen Methoden bzw. Näherungsverfahren lösen. Beim vorliegenden Problem ist ein einfacher Ansatz möglich.

Es wird angenommen, daß die Geschwindigkeit, mit der die Cu(II)-Ionen in die Membran strömen, klein ist gegen die Geschwindigkeit, mit der die Proteine des Sauerstoff entwickelnden Enzymsystems die Ionen binden. Diese Annahme scheint plausibel, da die Konzentration bindender Proteine mit ca. 10^{-5} M/L, bezogen auf das gesamte Membranzvolumen, sehr groß ist gegen die Löslichkeit von Cu(II) in nicht-polaren Medien. (Dieser Konzentrationswert wurde berechnet unter der Annahme von einem Protein pro Enzymsystem.)

Weiterhin ist die Cu(II)-Bindungskonstante des Proteins mit $pK_M = 5,3$ groß.

Dann gilt als erste Randbedingung, daß die Konzentration an freien Cu(II)-Ionen in der Membran ständig Null ist.

$$[Cu]_{\text{innen}} = 0$$

Im Kapitel (VI) wird gezeigt, daß die Membranen sehr wenig Cu(II) aus dem Puffer entfernen.. Daher kann als zweite Randbedingung bestimmt werden:

$$[Cu]_{\text{außen}} = [Cu]_0$$

Damit kann der Konzentrationsgradient über die Membran als konstant angenommen werden, und das erste Ficksche Gesetz beschreibt den Fluß der Ionen in die Membran:

$$F = -D \cdot \text{grad}[Cu]$$

Die in die Membran diffundierte Molzahl $M(t)$ ist dann:

$$M(t) = -D \cdot O_T \cdot [Cu]_0 \cdot t$$

Umgerechnet auf das Membranzvolumen ergibt sich:

$$S(t) = \frac{D}{d} [Cu]_0 \cdot t$$

wobei $S(t)$ die vom Protein gebundene Cu(II)-Konzentration, d die Membrandicke und O_T die Größe der Membranoberfläche bezeichnet.

Da $S(t) = [\text{PCu}(t)]$, die Konzentration des Cu-Protein-Komplexes, und da

$$\frac{\text{PCu}}{P_0} = 1 - \frac{v}{v_0}$$

gibt die Gleichung

$$\frac{v}{v_0} = 1 - \frac{D}{d P_0} \text{Cu}_0 \cdot t \quad (12)$$

die restliche Sauerstoffentwicklung in Abhängigkeit von der Cu(II)-Konzentration im Puffer und von der Inhibierungszeit an. Sie erklärt die Kinetiken nullter Ordnung (Abb. 47 und 48). Bei geringen Cu(II)-Konzentrationen ist keine völlige Inhibierung zu erreichen. Gleichung (12) beschreibt dies nicht, da das zugrunde liegende Modell von einer irreversiblen Bindung ausgeht, und den Zerfall des Komplexes vernachlässigt. Dies ist bei einer Bindungskonstante $pK_M = 5,3$ über den größten Teil des Konzentrationsbereiches eine gute Näherung. Gleichung (12) gilt dementsprechend auch für die Halbwertszeit der Inhibierung $v/v_0 = 0,5$ genügend exakt.

Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

Nach Gleichung (12) ist eine lineare Abhängigkeit der Inhibierungsgeschwindigkeit von der Cu(II)-Konzentration im Puffer zu erwarten. Für die Halbwertszeit der Inhibierung gilt dann:

$$D \cdot t = \frac{[P_0] d}{2[\text{Cu}_0]}$$

Abb. 49 zeigt, daß der Diffusionskoeffizient über einen Bereich von $5 \cdot 10^{-5}$ bis $2,5 \cdot 10^{-4}$ M/L Cu(II) konstant ist. Seine Größe wurde graphisch bestimmt:

$$D = 1,0 \cdot 10^{-8} \text{ [cm}^2 \text{ sec}^{-1}\text{]}$$

Dieser Wert ist nur als in der Größenordnung richtig zu betrachten, da das Modell sehr einfach ist, und die Daten für Membrandicke und Proteinkonzentration keine exakten Werte darstellen.

Bei höheren Konzentrationen ($\text{Cu(II)} \geq 0,5 \text{ mM/L}$) nimmt

der Diffusionskoeffizient ab. Dies kann mit einer Beobachtung von Dilley und Rothstein (1967) erklärt werden: Bei Zugabe von Cu(II) in mM/L-Konzentrationen schrumpft das Volumen der Membranen bis zu 20%.

Der Prozeß der Inhibierung der Sauerstoffentwicklung kann also beschrieben werden als Bindung von Cu(II) an ein Protein des Enzymsystems. Die Geschwindigkeitsgleichung der Inhibierung entspricht einer Diffusion der Ionen an die Bindungsstelle.

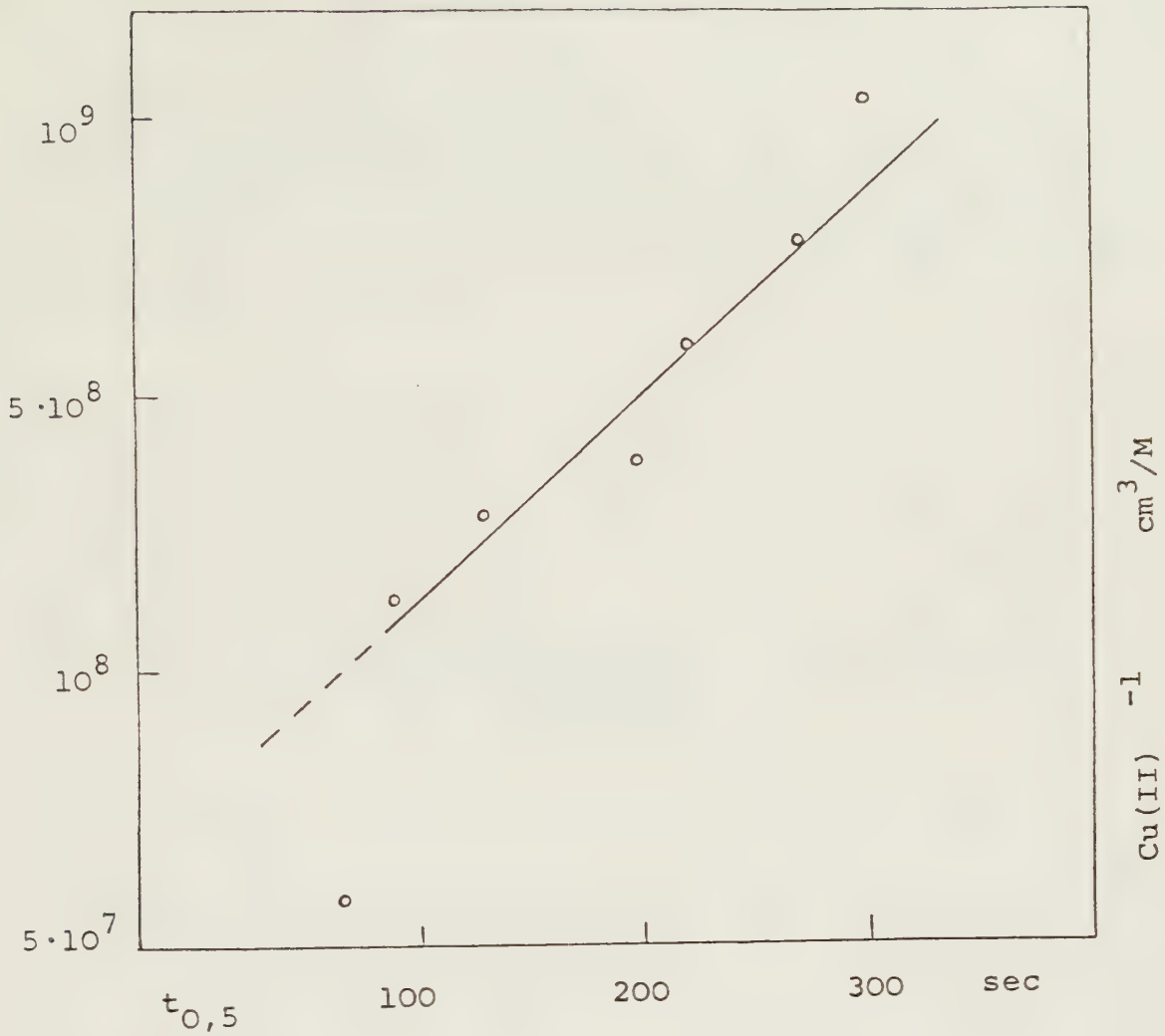


Abb. 49

Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

Daten aus Abb. 40 + 41 berechnet nach Gleichung (12)
 $t_{0,5}$ gibt die Zeit an, bei der die Sauerstoffentwicklung zur Hälfte inhibiert ist. Die Cu(II)-Konzentration wurde berechnet unter der Berücksichtigung der Bindung durch den Puffer. Die Steigung der Geraden gibt den Diffusionskoeffizienten an.

B) Die Temperaturabhängigkeit der Inhibierung

Im vorausgegangenen Kapitel ist gezeigt worden, daß sich der Reaktionsmechanismus der Inhibierung erklären läßt als eine diffusionsgekoppelte Komplexbildung zwischen einem Membranprotein und einem Cu(II)-Ion.

Dieser Diffusionsprozeß muß sich auf die Aktivierungsenergie der Inhibierung auswirken.

Die Abb. 51+52 zeigen die verbliebene Sauerstoffentwicklung nach einer Cu(II)-Inkubation im Licht bei entsprechender Temperatur. Aus ihr läßt sich die Geschwindigkeit der Inhibierung berechnen. Die Daten wurden in den Abb. 53+54 zusammengefaßt. Für die Aktivierungsenergie der Sauerstoffentwicklung ergeben sich übliche Werte. Die Aktivierungsenergie der Inhibierungsreaktion beträgt 54 ± 8 KJ/M. Aus ihr läßt sich die Enthalpie ΔH der Reaktion berechnen

$$\Delta H = E_a - RT = 54 \pm 8 \text{ KJ/M}$$

Das ist für eine einfache Komplexbildung ein relativ hoher Wert. Für Modellkomplexe liegen die Werte zwischen 12 und 40 KJ/M (Roche, Wilkins 1974, Friedberg 1974).

Für den Cu(II)-Komplex wurde eine Freie Reaktionsenthalpie

von $\Delta G = -30$ KJ/M bestimmt.

Mit $\Delta G = \Delta H - T\Delta S$ ergäbe dies eine Entropiezunahme ΔS von 277 J/M K. Dies wäre ebenfalls ein durchaus ungewöhnlicher Wert. Entropiewerte für derartige Komplexe sind in der Regel negativ und liegen zwischen -8 und -160 J/M K, solange keine Denaturierung vorliegt (Roche und Wilkins 1974). Diese Abweichungen lassen sich aber gut erklären, wenn man die Diffusion der Cu(II)-Ionen berücksichtigt: Wenn vor der Komplexbildung eine Diffusionsbarriere zu überwinden ist, so ist zu erwarten, daß die Aktivierungsenergie der Gesamtreaktion sich zusammensetzt aus der der Diffusion und der der Komplexbildung. Daher muß die Aktivierungsenergie der Inhibierungsreaktion höher sein als die der Komplexbildung. Das wird auch beobachtet.

Im vorhergehenden Kapitel sind Ergebnisse gezeigt worden, die darauf hinweisen, daß die Inhibierungsstelle in einer lipophilen Region der Membran liegt.

Kinetische Untersuchungen ergaben nun, daß sich die inhibierende Reaktion erklären läßt als diffusionsgekoppelte Komplexbildung zwischen Cu(II) und einem funktionellen Membranprotein.

Tab. 50

Die Aktivierungsenergie der Sauerstoffentwicklung und des Inhibierungsprozesses

geprüfte Reaktion	E_a [KJ/M]
Sauerstoffentwicklung von Chloroplasten	17,6
Sauerstoffentwicklung von mit 2,5 mM/L NH_4Cl entkoppelten Chloroplasten	24,4
Inhibierungsreaktion (berechnet nach Gleichung 3)	54,6

Graphische Bestimmung aus den Abb. 53 und 54

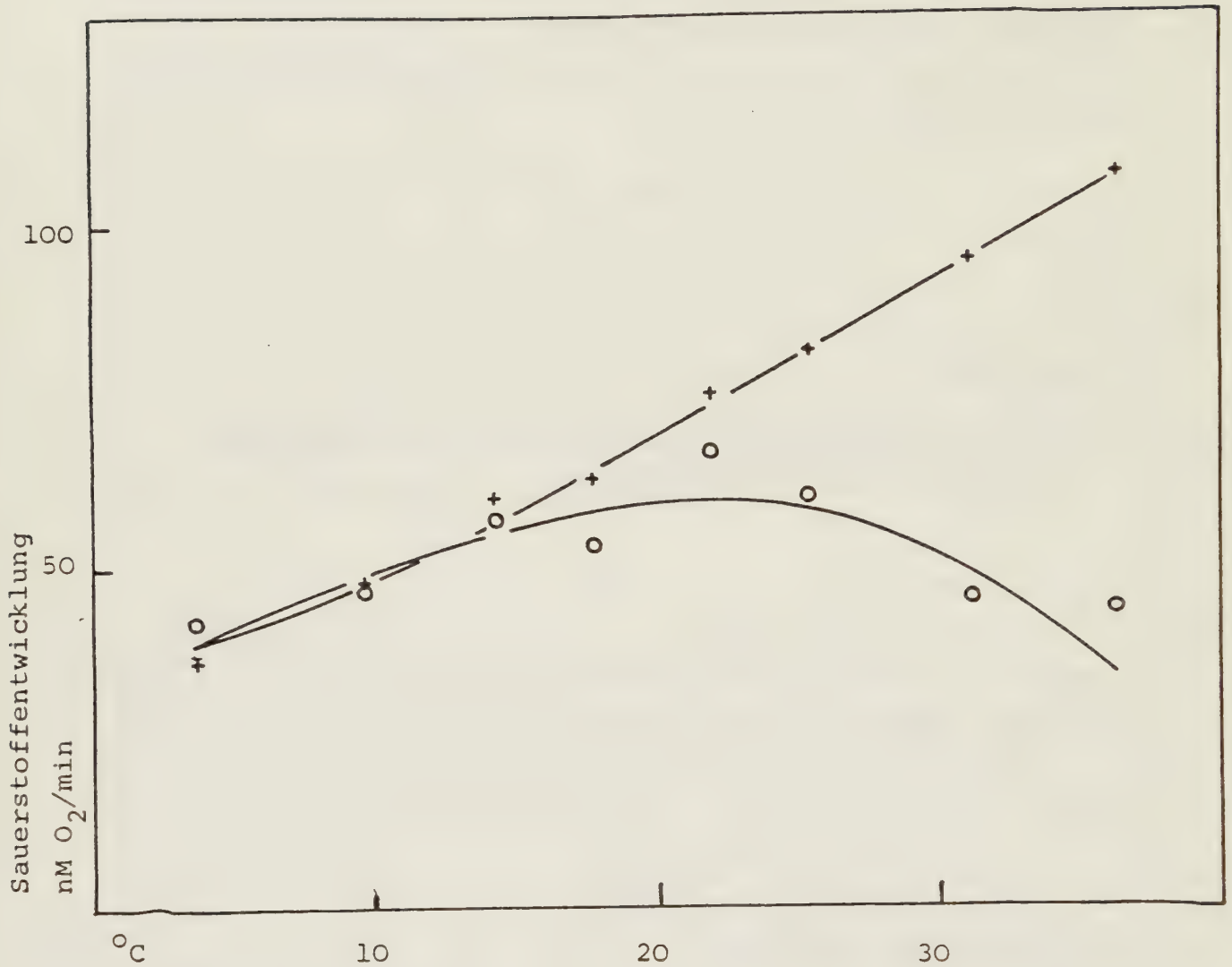


Abb. 51

Temperaturabhängigkeit der Cu(II)-Inhibierung

Chloroplasten wurden 2 min bei 0,2 mM/L CuSO₄ lichtinkubiert.

Danach wurden sie mit 2,5 mM/L NH₄Cl entkoppelt.

Akzeptor: 2 mM/L Fecy

+ + + Kontrolle

o o o Cu-inkubierte Chloroplasten

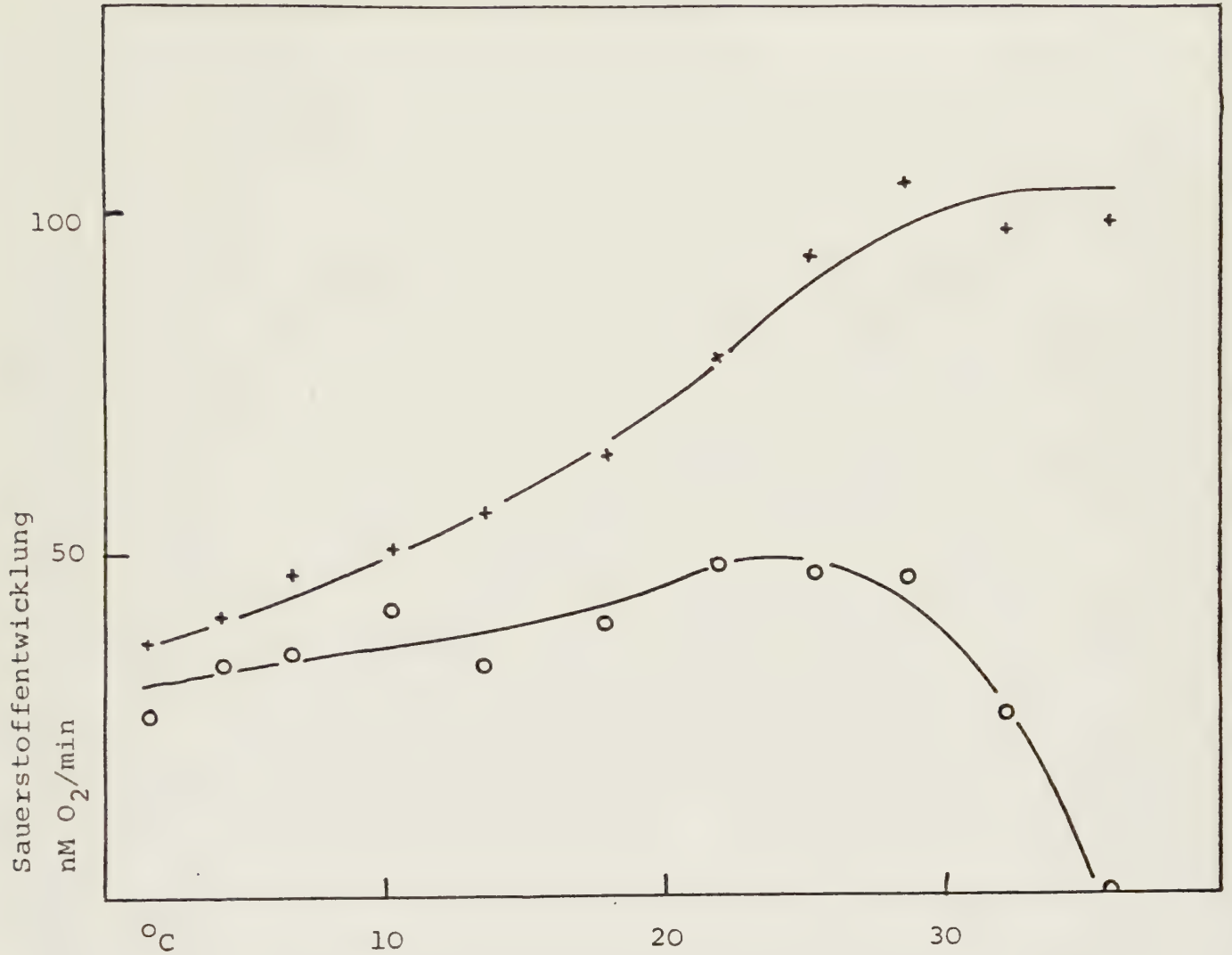


Abb. 52

Temperaturabhängigkeit der Cu(II)-Inhibierung

Chloroplasten wurden 4 min bei 0,2 mM/L CuSO₄ lichtinkubiert.
Akzeptor: 2 mM/L Fecy

+ + + Kontrolle

o o o Cu-inkubierte Chloroplasten

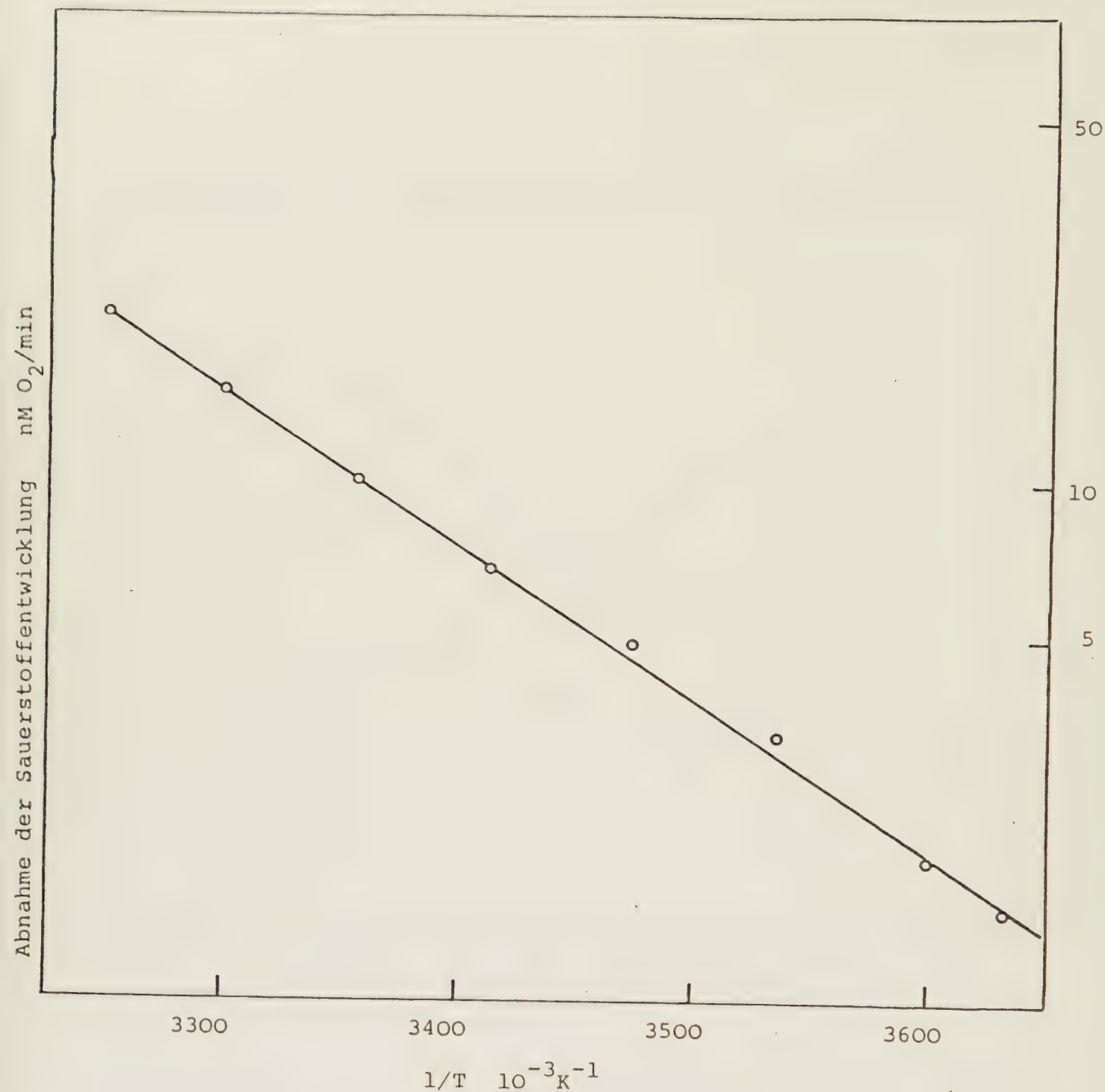


Abb. 53 Arrhenius - Diagramm des Inhibierungsprozesses

Chloroplasten wurden bei 200 $\mu\text{M/L}$ CuSO_4 lichtinkubiert. Danach wurden 2.5 mM/L NH_4Cl zur Entkopplung und 2 mM/L Fecy als Akzeptor zugegeben.

Die Geschwindigkeit des Inhibierungsprozesses wurde aus den Daten von Abb. 51 + 52 berechnet.

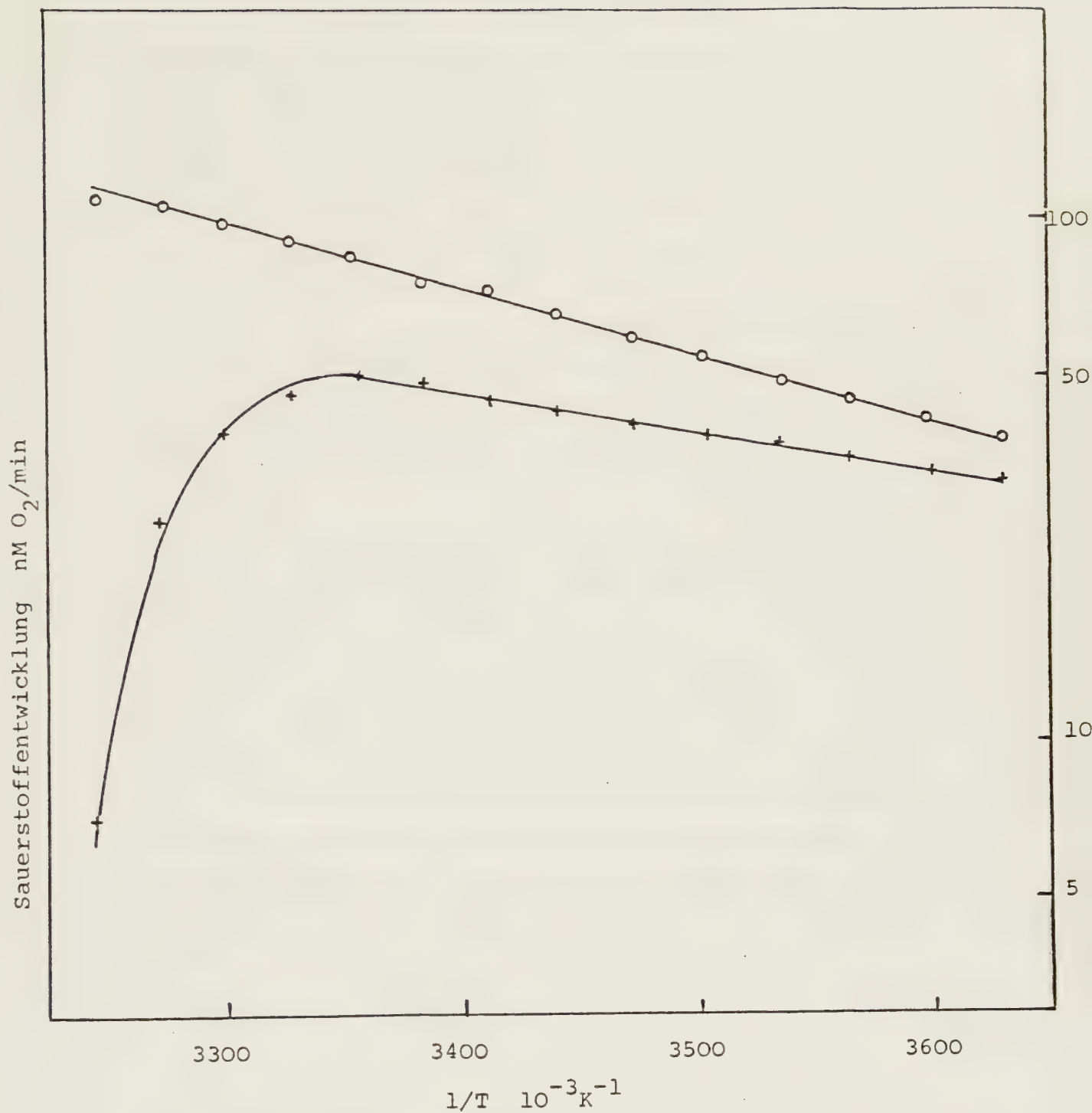


Abb. 54 Arrhenius-Diagramm der Sauerstoffentwicklung

ooo unbehandelte Chloroplasten

+++ Cu-inhibierte Chloroplasten

Chloroplasten wurden bei 200 μ M/L CuSO₄ lichtinkubiert. Danach wurde 2.5 mM/L NH₄Cl zur Entkopplung und 2 mM/L Fecy als Akzeptor zugegeben. Inhibierungszeit 2 min.

Die Meßpunkte stellen die Mittelwerte der Daten aus Abb. 51+52 dar.

V) Der Cu(II)-reaktive Zustand der Membran

Im bisherigen Verlauf der Untersuchung sind kinetische und thermodynamische Hinweise dafür vorgelegt worden, daß die Cu(II)-Ionen, bevor sie mit einem funktionellen Membranprotein reagieren und es so inaktivieren, eine Diffusionsbarriere zu überwinden haben. Diese Vorstellung entspricht auch den Untersuchungen über den Inhibierungsort; nach den bisher bekannten Ergebnissen liegt diese Stelle in einer lipophilen Region der Membran.

Vorausgegangene Experimente (Cedeno-Maldonado et al. 1972) ergaben nun, daß die Aktivität von Photosystem II durch Inkubation mit CuSO_4 gehemmt wird, allerdings nur bei gleichzeitiger Belichtung, nicht aber im Dunkeln. Dies kann mehrere Gründe haben:

- 1) Ein funktionelles Protein von Photosystem II wird durch Oxidation im Rahmen des photosynthetischen Elektronentransportes in einen Cu(II)-reaktiven Zustand versetzt.
- 2) Ein Protein von Photosystem II führt im Licht eine Konformationsänderung aus, die von der pH-Änderung im Thylakoid-Innenraum im Licht induziert wird. Diese Konformationsänderung macht eine funktionelle Gruppe des Proteins für Cu(II)-Ionen zugänglich.
- 3) Im Licht findet eine Konformationsänderung der Membran statt. Dies macht eine funktionelle Gruppe eines Proteins von Photosystem II für Cu(II) zugänglich; es erleichtert die Diffusion der Ionen zur Bindungsstelle.

Um unter diesen verschiedenen Möglichkeiten zu unterscheiden, wurden einige Experimente durchgeführt.

A) Die Lichtintensitätsabhängigkeit der Inhibierung

Mauzerall (1976) beobachtete, daß der Ertrag der variablen Fluoreszenz von Chloroplasten dem Poissonschen Gesetz folgt, allerdings nur bei niedriger Lichtintensität I:

$$P^* = P_0 (1 - \exp(-\sigma I))$$

wobei P^* / P_0 den angeregten Bruchteil der Chlorophyllmoleküle bezeichnet. Für höhere Lichtintensitäten muß der Elektronentransport berücksichtigt werden: Die Geschwindigkeit der Quantennutzung dN / dt in PS II ist proportional zur Fraktion B der absorbierten Lichtintensität, der Geschwindigkeitskonstanten k_E des Exzitoneinfangs, dem Bruchteil offener Reaktionszentren $[Z P Q] / [Z P Q]_0$ und der Lebenszeit τ der Anregung der Pigmentaggregate (Melis, Homann 1975):

$$\frac{dN}{dt} = B \cdot I_0 \cdot k_E \cdot \frac{[Z P Q]}{[Z P Q]_0} \quad (16)$$

Die Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung läßt sich als Geschwindigkeit der Quantennutzung ausdrücken: Pro Sauerstoffmolekül werden 4 Quanten gebraucht. Ersetzt man den Bruchteil offener Zentren durch den geschlossener Zentren Θ , so gilt

$$v = \alpha \cdot I_0 \cdot (1 - \Theta) \quad (17)$$

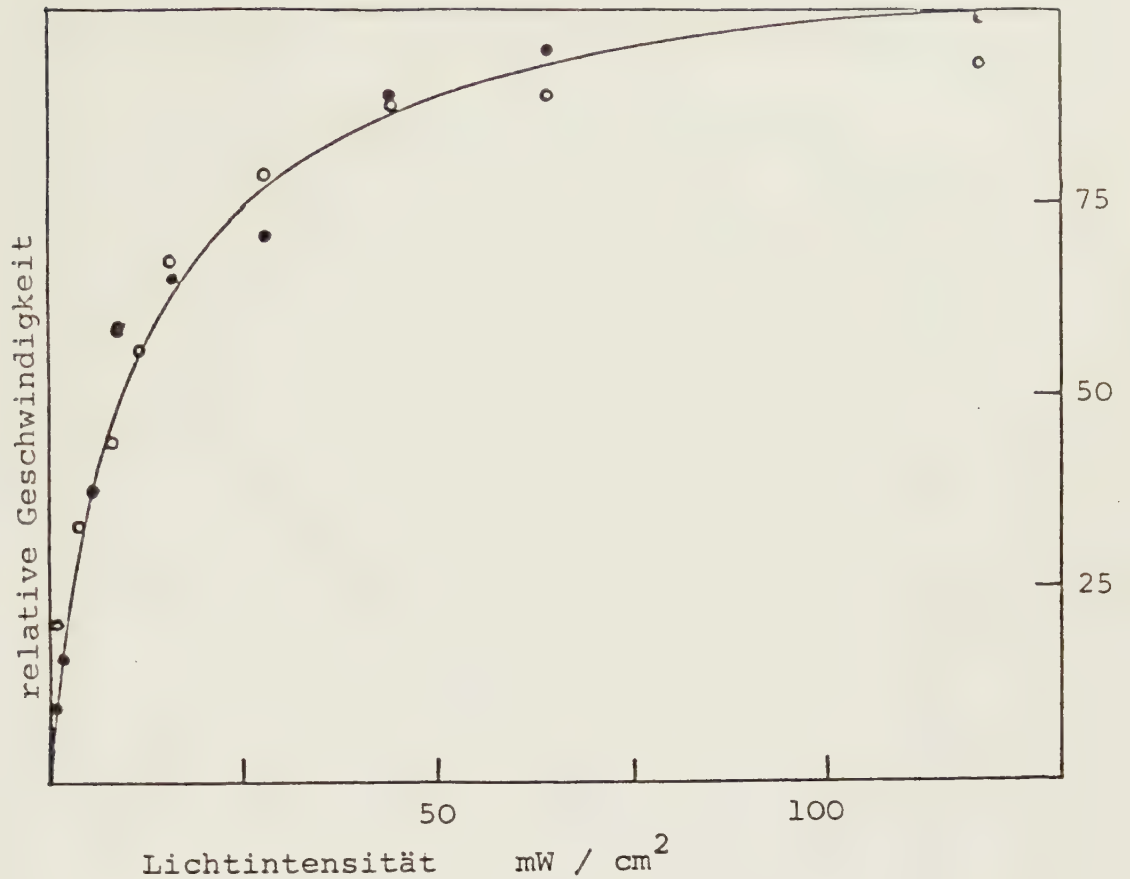
wobei α die Konstanten B, k_E und τ umfaßt.

Mit dieser Formel läßt sich aus der meßbaren Sauerstoffentwicklung der Bruchteil Θ der geschlossenen Reaktionszentren im kontinuierlichen Licht unterschiedlicher Intensität berechnen.

Abb. 55 zeigt die Abhängigkeit der Inhibierung der Sauerstoffentwicklung nach 2 min Lichtinkubation mit Cu(II) von der Lichtintensität. Sie folgt derselben Sättigungscharakteristik wie die Sauerstoffentwicklung ohne Cu(II); daher besteht zwischen ihnen ein linearer Zusammenhang (Abb. 56).

Mit Hilfe von Gleichung (16) und (17) läßt sich die Inhibierungsgeschwindigkeit als Funktion der geschlossenen Zentren während der Lichtinkubation darstellen (Abb. 57). Es ergibt sich eine direkte Proportionalität. Dies kann als Hinweis gewertet werden, daß nur geschlossene Zentren von Cu(II) angegriffen werden. Dies entspräche der Interpretation, daß eine durch den photosynthetischen Elektronentransport oxidierte Komponente von PS II mit Cu(II) reagiert.

Andererseits folgt der Anregung der Zentren ein elektrisches Feld und ein pH-Gradient über die Membran. Es ist daher möglich, daß erst sekundäre Vorgänge den Cu-reaktiven Zustand erzeugen. Dieses Experiment erlaubt noch keine eindeutige Interpretation.



Sättigungscharakteristik von Sauerstoffentwicklung
und Inhibierung

● Geschwindigkeit der Inhibierung

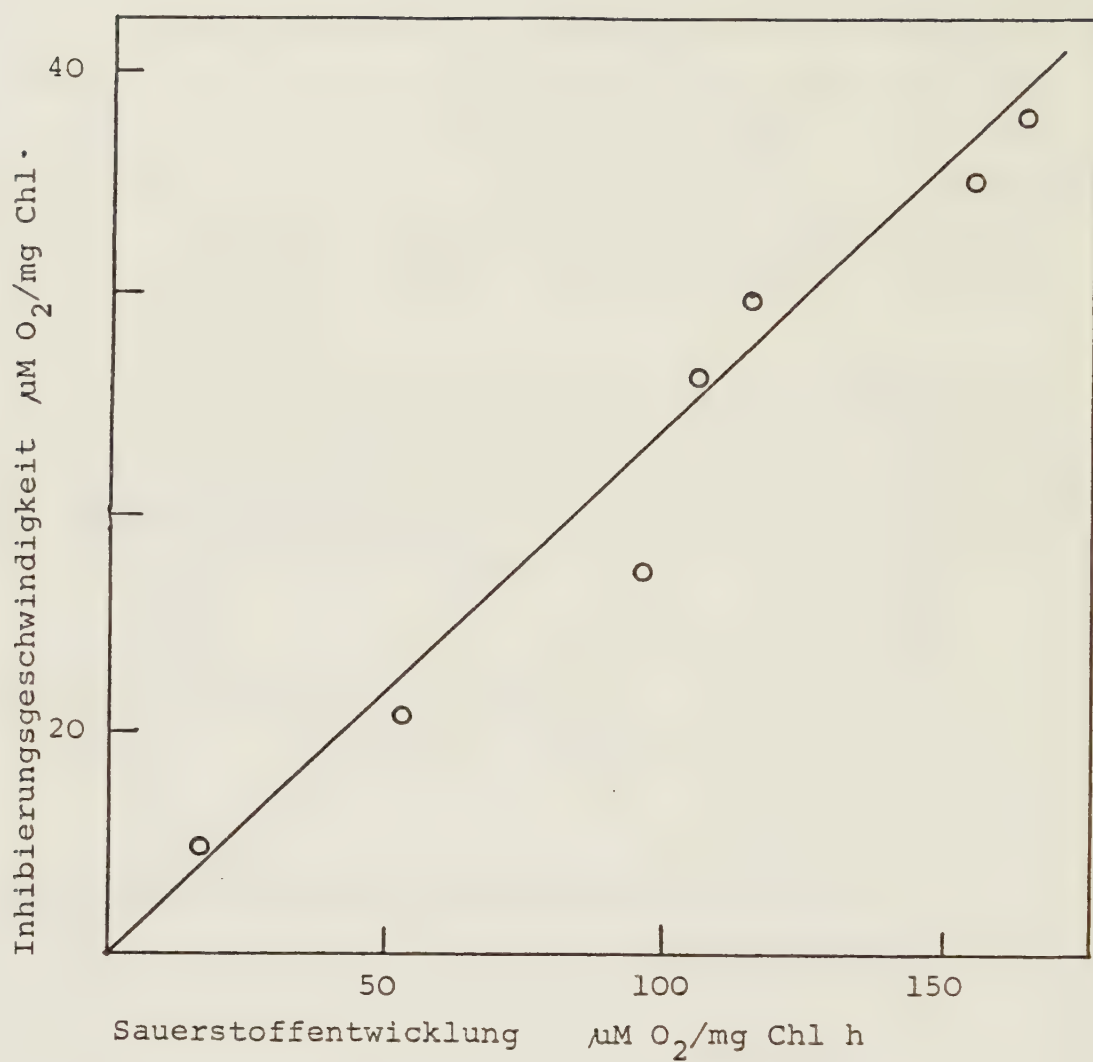
○ Geschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung

geprüfte Reaktion: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Simo} + \text{DCMU}$

Kontrollrate $163 \mu\text{M O}_2 / \text{mg Chl h}$

Aktivitätsmessungen bei 85 mW/cm^2 . Cu(II)-Inkubation bei der entsprechenden Lichtintensität. 1 min Lichtadaption und 2 min Cu(II)-Inkubation. $500 \mu\text{M/L CuSO}_4$; $200 \mu\text{M/L Simo}$; $4 \mu\text{M/L DCMU}$; 20°C .

Abb. 61



Abhängigkeit der Inhibierungsgeschwindigkeit
von der Sauerstoffentwicklung

Daten aus Abb. 55

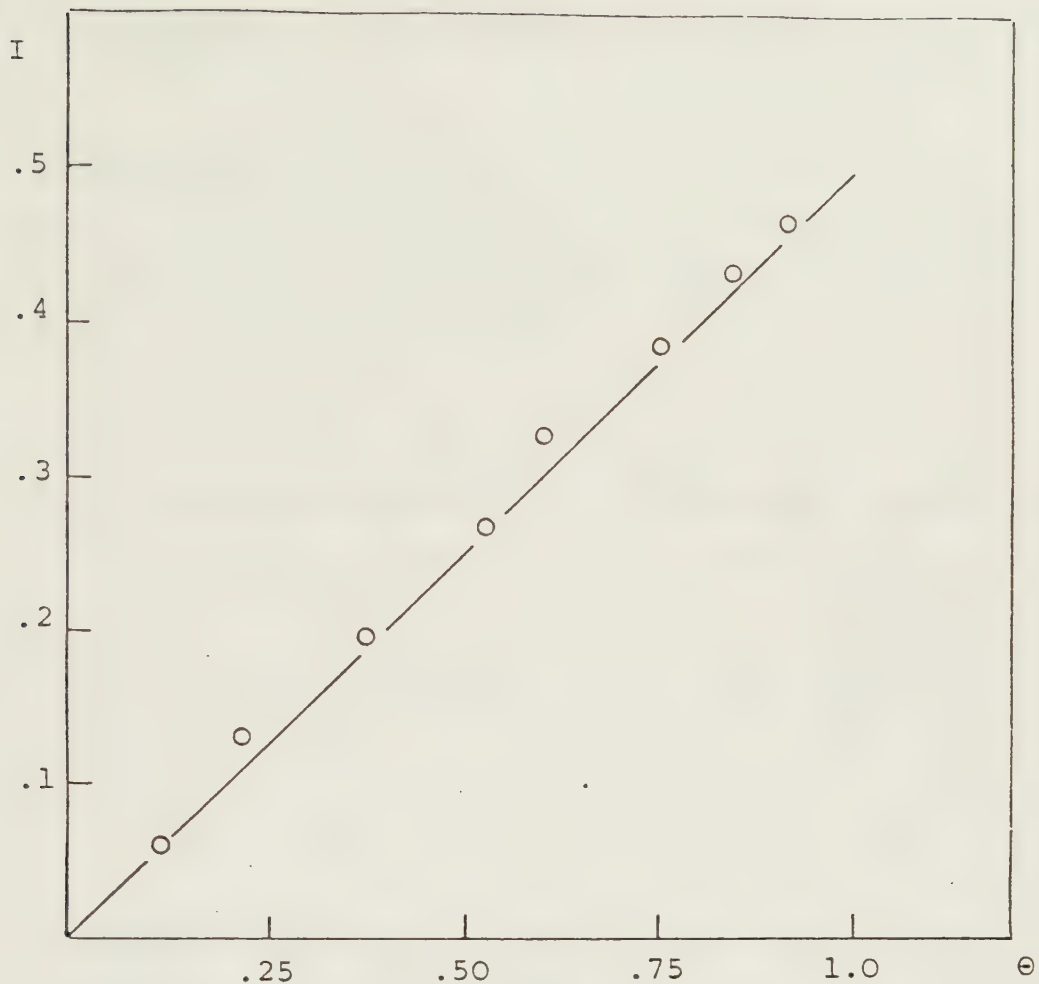


Abb. 57

Die Abhängigkeit der Inhibierung vom Bruchteil θ der Zentren, die ein elektrisches Feld über die Membran aufspannen.

Daten aus Abb. 55

Berechnet wurden der Bruchteil inaktivierter Zentren nach 1 min Inkubation mit 0,5 mM/L CuSO_4 im Licht und der Bruchteil von Zentren während der Inkubation, die ein elektrisches Feld über die Membran aufspannen. Variierter Parameter ist die Lichtintensität.

B) Die Abhängigkeit der Inhibierung vom Redoxzustand von PS II

Es ist gezeigt worden, daß die Inhibierungsgeschwindigkeit proportional zum Bruchteil der Zentren ist, die ein elektrisches Feld über die Membran aufspannen. Dies kann auf einen direkten Mechanismus hinweisen: Eine Komponente von PS II wird durch den Elektronentransport im Licht oxidiert und kann in diesem Zustand mit Cu(II) reagieren. Dieses Ergebnis wurde über die Variation der Lichtintensität erzielt. In einem weiteren Experiment soll dasselbe Ergebnis durch Zugabe von Reagentien erzielt werden.

DCMU blockiert den Elektronentransport auf der reduzierenden Seite von PS II. Q^- wird nur noch langsam durch eine Rückreaktion mit Ladungen aus dem Sauerstoff entwickelnden System oxidiert (Vierke 1979). Im kontinuierlichen Licht führt die Gegenwart von DCMU daher zu einer erhöhten Konzentration an geschlossenen Zentren.

DCIP wirkt als Elektronenakzeptor auf der reduzierenden Seite von PS II und hat daher im vorliegenden Experiment den gegenteiligen Effekt von DCMU: Es verringert die Konzentration an geschlossenen Zentren.

Mn(II) wird im Licht von Z_1 photooxidiert (Govindjee 1978). Es sinkt daher ebenfalls die Konzentration an geschlossenen Zentren.

Diese Reagentien wurden vor bzw. nach der Lichtinkubation der Chloroplasten mit $CuSO_4$ zugegeben und die Inhibierung gemessen. Tab. zeigt, daß die durch DCMU erhöhte Konzentration an geschlossenen Zentren zu leicht verstärkter Inhibierung führt, während DCIP und besonders $MnSO_4$ die Inhibierung abschwächen.

Dies ist ein weiter Hinweis darauf, daß die Konzentration von Zentren, die ein elektrisches Feld über die Membran bilden, die Inhibierungsgeschwindigkeit bestimmt, und nicht die Geschwindigkeit des Elektronentransportes, wie es etwa Abb. 56 nahelegen würde.

In der Gegenwart von DCIP wird ein pH-Gradient über die Membran gebildet, während dies ohne Elektronenakzeptor in der Gegenwart von DCMU kaum möglich ist. Trotzdem ist der Unterschied in der Inhibierung gering. Offenbar spielt der pH-Gradient eine geringe Rolle bei der Erzeugung des Cu-reaktiven Zustands. Ein weiteres Experiment soll dies bestätigen.

Tab. 58

Abhängigkeit der Inhibierung vom Redoxzustand von PS II

Reaktion	O ₂ -Entwicklung μM O ₂ /mg Chl h	
		%
H ₂ O → Simo	85	
H ₂ O → Simo + DCMU	79	100
H ₂ O → Simo + DCMU + Cu(II)		
DCMU vor der Inhibierung	52	66
DCMU nach der Inhibierung	48	61
H ₂ O → Simo + DCIP	84	100
H ₂ O → Simo + DCIP + Cu(II)		
DCIP vor der Inhibierung	49	58
H ₂ O → Simo + Mn(II)	90	100
H ₂ O → Simo + Mn(II) + Cu(II)		
Mn(II) vor der Inhibierung	65	81

500 μM/L CuSO₄; 100 μM/L MnCl₂; 200 μM/L Simo; 400 μM/L DCIP; 4 μM/L DCMU; 2 min Cu(II)-Lichtinkubation bei 8 mW/cm²; bei dieser Lichtintensität ist der Elektronentransport auf ca. 50% seines Maximalwertes.

C) Die Abhängigkeit der Inhibierung vom pH-Gradienten

Im Licht wird der pH-Wert des Innenraums der Thylakoid-Vesikel um ca. drei Einheiten kleiner. Derartige pH-Änderungen können Konformationsänderungen von Proteinen auslösen. Es wäre daher denkbar, daß der im Licht entstehenden pH-Gradient über die Membran den Cu-reaktiven Zustand herstellt.

Chloroplasten wurden daher mit verschiedenen Reagentien entkoppelt. Gramicidin D, Valinomycin und NH_4Cl zerstören den pH-Gradienten. Tab. 59 zeigt, daß dadurch die Geschwindigkeit der Inhibierung nur geringfügig verkleinert wird.

Es kann aufgrund dieser Ergebnisse ausgeschlossen werden, daß der Cu(II)-reaktive Zustand durch den pH-Gradienten erzeugt wird.

Tab. 59

Sauerstoffentwicklung nach Cu(II)-Inkubation in Gegenwart entkoppelnder Reagentien

	Kontrolle	Cu(II)-behandelt	
		nM O_2/min	% Inhibierung
Chloroplasten Kontrolle	51	5	90
+ 4 $\mu\text{M}/\text{L}$ Valinomycin	165	43	74
+ 10 $\mu\text{M}/\text{L}$ Gramicidin D	191	44	77
+ 2.5 mM/L NH_4Cl	104	11	80

1 min Lichtadaptiert, 5 min Cu(II)-Lichtinkubation

500 $\mu\text{M}/\text{L}$ CuSO_4 ; 2 mM/L Fecy geprüfte Reaktion $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fecy}$

D) Die Abhängigkeit der Inhibierung von der Anregungs-
Wellenlänge

In zwei Experimenten ist auf unterschiedliche Weise ein enger Zusammenhang zwischen dem Bruchteil geschlossener Reaktionszentren von PS II und der Inhibierungsgeschwindigkeit nachgewiesen worden. In einem weiteren Experiment soll geprüft werden, ob eine durch den Elektronentransport oxidierte Komponente von PS II mit Cu(II) reagiert, und so die Inhibierung ausgelöst wird.

Dazu wurden Chloroplasten mit CuSO_4 lichtinkubiert, aber nicht wie bisher mit weißem Licht, sondern mit Licht bestimmter Wellenlängen. Bei 658-nm-Beleuchtung wird PS II angeregt. Die Intensität des Lichtes liegt bei ca. 30 % der Sättigung. Eine entsprechende Sauerstoffentwicklung wurde beobachtet. 715-nm-Beleuchtung derselben Intensität regt PS II nicht an, wohl aber PS I. Dementsprechend kann auch keine Sauerstoffentwicklung beobachtet werden. Tab.61 zeigt diese Ergebnisse. Aufschlußreich ist die Tatsache, daß zwar PS II während der Lichtinkubation mit Cu(II) bei 715 nm nicht angeregt wird, trotzdem aber die Inhibierung einer Komponente zu beobachten ist, die zu PS II gehört.

Es kann damit ausgeschlossen werden, daß eine durch den Elektronentransport in PS II oxidierte Komponente mit Cu(II) reagiert. Dieses Experiment zeigt, daß ohne Elektronentransport durch PS II oder überhaupt ohne Anregung des Reaktionszentrums von PS II die Cu(II)-Inhibierung zu beobachten ist.

Damit kann jeder Mechanismus ausgeschlossen werden, der allein auf einer Redoxreaktion von PS II beruht. Es muß sich um einen anderen Mechanismus handeln; denn dieses Experiment zeigt, daß auch PS I den Cu-reaktiven Zustand von PS II erzeugen kann.

Bei PS I und PS II handelt es sich um separate Einheiten, die kürzlich auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen wurden (Miller 1979). Als Mittler für eine derartige Fernwirkung der Anregung von PS I kommt am ehesten Der elektrochemische Potentialgradient in Frage. Da schon gezeigt wurde, daß der pH-

gradient nur einen geringen Einfluß hat scheint es sich um den elektrischen Potentialgradienten zu handeln.

Tab. 61

Wellenlängenabhängigkeit der Inhibierung

		O ₂ -Entwicklung μM O ₂ /mg Chl h
Kontrolle		
658 nm Meßbeleuchtung	Interferenzfilter	48
715 nm Meßbeleuchtung	Interferenzfilter	--
420 nm Meßbeleuchtung	Kantenfilter	153
Cu(II)-Inkubierte		
658 nm Inhibierungsbeleuchtung, 420 nm Meßbeleuchtung		---
715 nm Inhibierungsbeleuchtung, 420 nm Meßbeleuchtung		---

1 min Lichtadaptiert, 5 min Cu(II)-Lichtinkubation;
 500 μM/L CuSO₄; 2 mM/L Fecy; geprüfte Reaktion $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Fecy}$.
 Lichtintensität während der Inhibierungsbeleuchtung 7 mW/cm².

E) Inhibierung während einer Zentrifugation

Falls der elektrische Potentialgradient den Cu-reaktiven Zustand erzeugt, ist folgender Mechanismus vorstellbar: Der elektrische Potentialgradient führt zu einer Konformationsänderung der Membran, die ihrerseits eine funktionelle Gruppe eines Membranproteins exponiert. Diese reagiert mit Cu(II).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Chloroplasten im Dunkeln in einer Zentrifuge in der Gegenwart von CuSO_4 beschleunigt. Diese Beschleunigung soll die Kräfte simulieren, die vom elektrischen Feld im Licht auf die Membran ausgeübt werden. Das elektrische Feld führt zu einem Druck senkrecht zur Membran:

$$P = \frac{\epsilon}{8\pi} E^2 d$$

Hier sei eine Dielektrizitätskonstante der Membran ϵ von 2,5 (Ohki 1968) angenommen, eine Membrandicke d von $40 \text{ \AA}$, und ein elektrisches Feld von 3 mV. Nach Witt (1979) sinkt das elektrische Feld im Gleichgewichtszustand auf wenige mV ab. Der berechnete Druck bewegt sich damit in der Größenordnung von $0,5 \text{ g/cm}^2$.

Nach Kirk (1971) kann eine mittlere Dichte ρ der Membran von $1,35 \text{ g/cm}^3$ angenommen werden. Für eine sedimentierte Membran beträgt die senkrechte Komponente des Beschleunigungsdruckes

$$P = \rho \cdot d \cdot b$$

Bei einer Beschleunigung b von 1000 g kann nach dieser Abschätzung dieselbe Kraft auf die Membran ausgeübt werden, wie sie das elektrische Feld bei kontinuierlicher Beleuchtung ausübt.

Abb. 63 zeigt, daß tatsächlich in der Gegenwart von CuSO_4 durch eine Zentrifugation bei 1000 g eine Inhibierung von PS II erreicht werden kann, während sonst im Dunkeln selbst

nach 5 min Inkubationszeit keinerlei Abnahme der Sauerstoffentwicklung zu beobachten ist (Abb. 62)

Dieses Ergebnis zeigt klar, daß der Cu-reaktive Zustand von einer Konformationsänderung hergestellt wird. Da die bei 1000 g auftretenden Kräfte zu gering sind, um eine Konformationsänderung von Proteinen zu bewirken, ist anzunehmen, daß die Konformation der Lipidmembran beeinflusst wird.

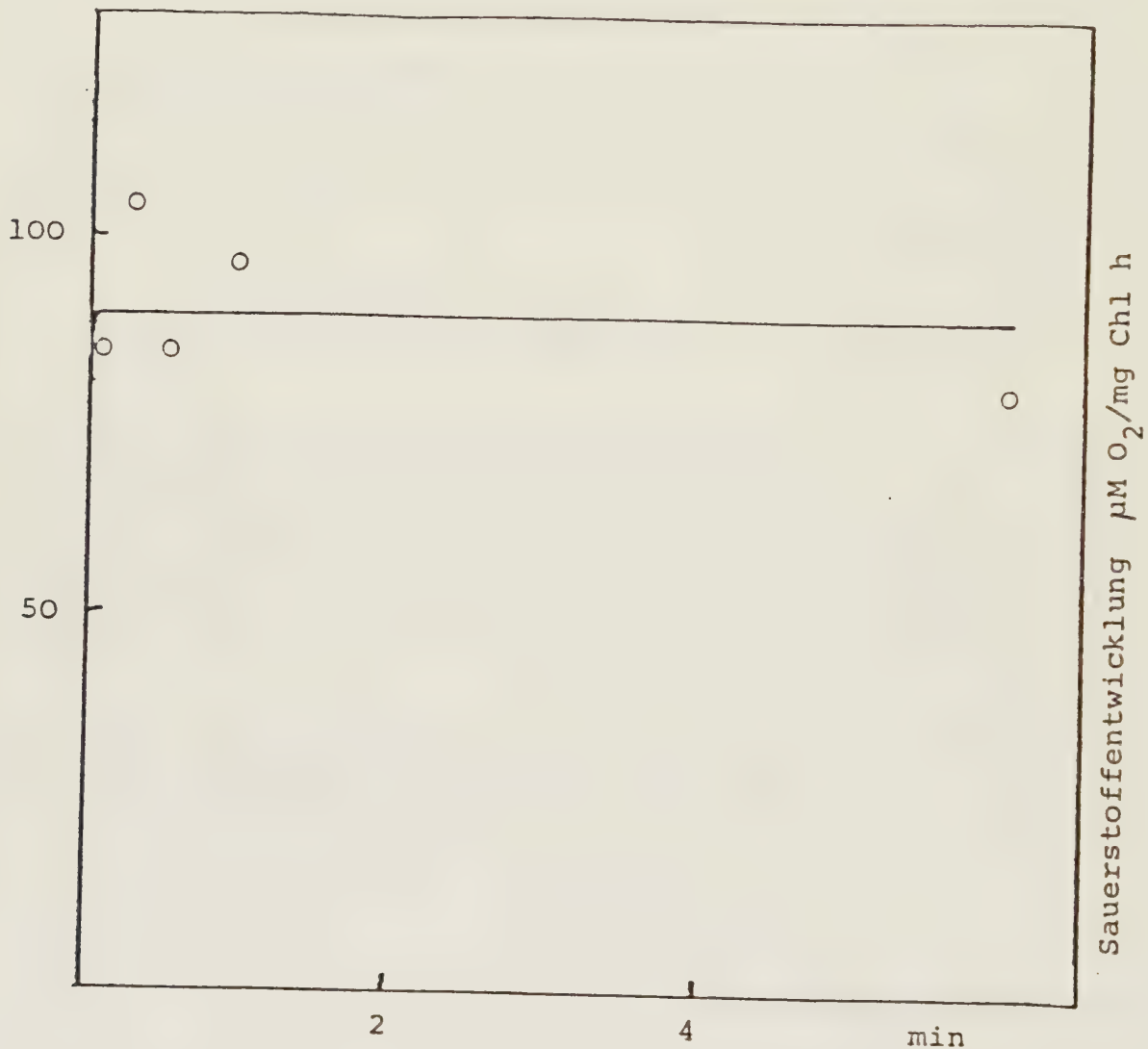


Abb. 62

O₂-Entwicklung nach Dunkelinkubation mit Cu(II)

Nach der entsprechenden Zeit der Cu(II)-Einwirkung im Dunkeln wurde SM und DCMU zugegeben und die O₂-Entwicklung gemessen.

dunkeladaptierte Chloroplasten, CuSO₄-Konz. 500 μM/L.
Daten sonst wie Abb.

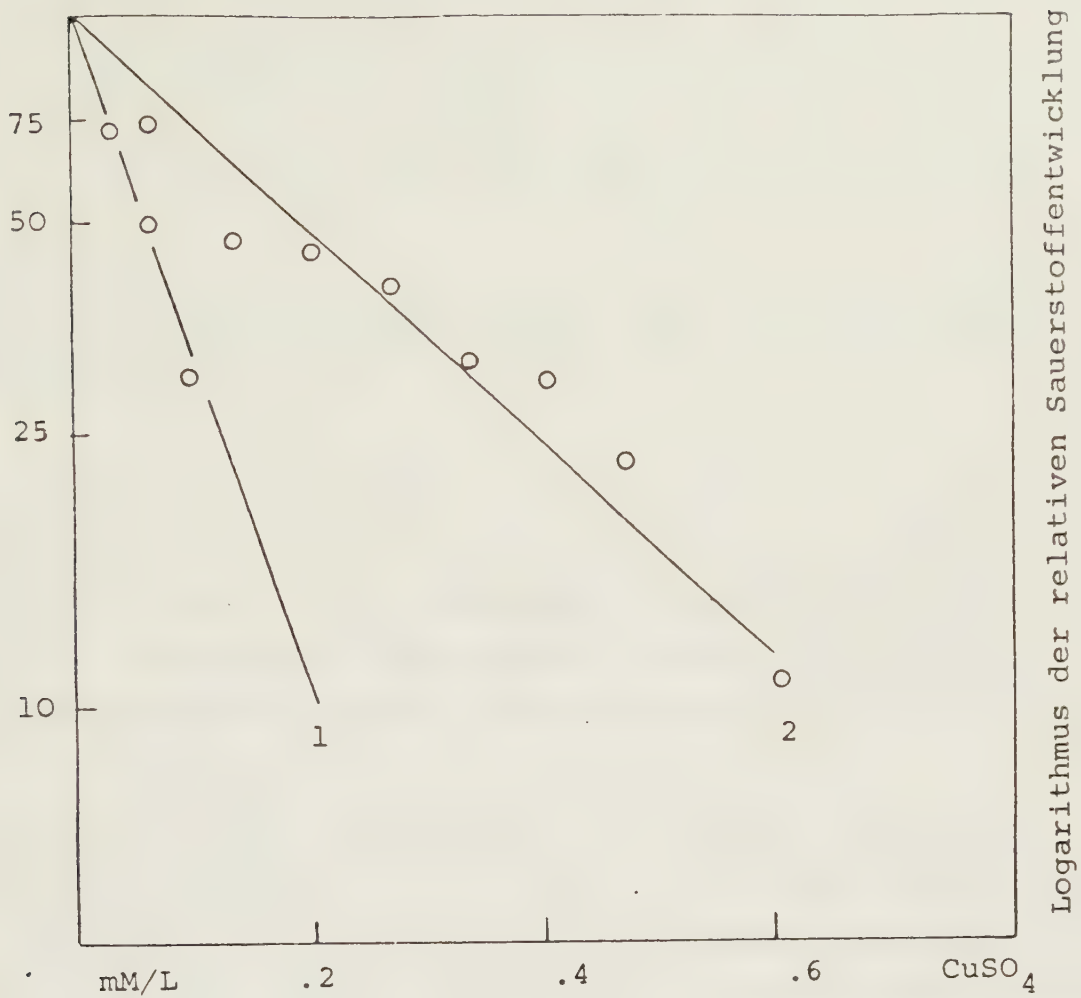


Abb. 63

Die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung durch Zentrifugation in der Gegenwart von CuSO_4

- 1 Inhibierung nach 10 min Cu(II) -Inkubation im Licht
- 2 Inhibierung nach 10 min 1000 g - Zentrifugation im Dunkeln in der Gegenwart von CuSO_4

geprüfte Reaktion: $\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Simo} + \text{DCMU}$

Kontrollrate vor der Zentrifugation 132 nM O_2/min , danach 113 nM O_2/min . 200 $\mu\text{M/L}$ Simo; 4 $\mu\text{M/L}$ DCMU; 20°C.

F) Ein mechanisches Modell der Konformationsänderung

Bisher konnte gezeigt werden, daß die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung darauf beruht, daß eine Konformationsänderung der Membran im Licht die Diffusion der Cu(II)-Ionen zu der entsprechenden Komponente des Elektronentransportes erlaubt.

Die Membran weist im Licht eine stark erhöhte Permeabilität für Cu(II)-Ionen auf, die in der Größe des Diffusionskoeffizienten ausgedrückt wurde.

Über die molekulare Natur der Konformationsänderung existieren keine Informationen. Theorien, die Permeabilitätsänderungen von Membranen beschreiben, gehen meist davon aus, daß Poren oder Kanäle die Diffusion ermöglichen (z.B. Goldmann 1964). In Anlehnung an derartige Theorien soll im Folgenden die Konformationsänderung der Membran als Porenmodell entwickelt werden.

Die erhöhte Permeabilität der Membran im Licht, bisher auf eine Konformationsänderung zurückgeführt, entspricht einer erhöhten Porendichte. Im Dunkeln ist die Permeabilität dann sehr gering, entsprechend einer sehr kleinen Porendichte. Die Konformationsänderung der Membran bewirkt also eine Erhöhung der Porendichte.

Im einfachsten Fall ist der Fluß der Ionen durch eine Oberflächeneinheit der Membran proportional zur Zahl der Poren pro Oberflächeneinheit (Hille 1969).

Da

$$F = - D \cdot \text{grad } C \quad \text{1. Ficksches Gesetz}$$

ist die Porendichte auch proportional zum Diffusionskoeffizienten:

$$n = G \cdot D$$

Dabei bezeichnet D den Diffusionskoeffizienten, C die Konzentration der diffundierenden Ionen im äußeren Medium, F den Fluß der Ionen in die Membran, n die Porendichte und G einen Faktor, der von der Geometrie und den Eigenschaften der Poren abhängt.

Nach Gleichung (12) kann der Diffusionskoeffizient der Membran über die Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung bestimmt werden:

$$\frac{v}{v_0} = 1 - \frac{D}{d [P_0]} [Cu_0] \cdot t$$

Bezeichnet n_1 die Porendichte der Membran in einem Zustand 1, n_2 die in einem Zustand 2, kann die einfache Beziehung abgeleitet werden:

$$\frac{v_0 - v_1}{v_0 - v_2} = \frac{n_1}{n_2} \quad (13)$$

wobei v_0 den Kontrollwert der Sauerstoffentwicklung und v_1 , v_2 die Werte nach einer bestimmten Inhibierungszeit beim jeweiligen Zustand der Membran bezeichnen. Diese Gleichung erlaubt, durch Messungen der Sauerstoffentwicklung auf relative Änderungen der Porendichte zu schließen.

Es wurde gezeigt, daß der Fluß der Cu(II)-Ionen in die Membran proportional zum Bruchteil der Zentren ist, die ein elektrisches Feld über die Membran aufspannen.

Theorien über Permeabilitätsänderungen von Membranen unter Einfluß von elektrischen Feldern basieren fast alle auf der direkten Wirkung des Feldes auf Ladungen oder Dipole, die mit der Membran assoziiert sind (Schwarz 1978). Goldmann (1964) entwickelte eine Theorie, nach der Membran-Phospholipide unter Einfluß des Feldes ihre Orientierung ändern, und so Poren bilden.

Das elektrische Feld über die Thylakoidmembran entsteht innerhalb von Nanosekunden nachdem Einschalten des Lichtes und hat eine Abklingzeit nach dem Ausschalten von ca. 100 msec (Witt 1979).

Es wurde ein Experiment entwickelt, mit dem Informationen über die An- und Abklingzeiten der Konformationsänderungen zu erhalten sind. Damit sollte geprüft werden, ob sie in derselben Größenordnung wie die des elektrischen Feldes liegen.

Chloroplasten wurden mit intermittierendem Licht in der Gegenwart von CuSO_4 bestrahlt, und die Inhibierung nach einer bestimmten Zeit gemessen.

Im kontinuierlichem Licht ist, wie gezeigt, der Diffusionskoeffizient konstant. Dies entspricht der Licht- Konformation der Membran, die die Diffusion der Cu(II) -Ionen erlaubt.

Im periodisch unterbrochenen Licht "schaltet" die Membran ständig zwischen der Licht- und der Dunkel- Konformation hin und her. Im Porenmodell entspricht dies dem Öffnen und Schließen von Poren. Sind die Licht- und Dunkelphasen bei gleicher Länge groß gegen die Öffnungs- und Schließzeiten, so wird der Fluß der Ionen in die Membran einfach halbiert.

Für die Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung hieße dies nach Gleichung (12), daß nur die halbe Inaktivierung zu erwarten wäre.

Abb. (64) zeigt, daß dies nicht zutrifft. Die Geschwindigkeit der Inhibierung ist abhängig von der Phasenlänge. Ist diese sehr klein, hat die Inhibierung dasselbe Ausmaß wie bei kontinuierlicher Beleuchtung.

Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Länge der Phasen in der Größenordnung der Öffnungs- und Schließzeiten der Poren liegt.

Im Folgenden wird ein einfaches kinetisches Modell entwickelt, mit dem sich die Halbwertszeiten näherungsweise bestimmen lassen.

Im kontinuierlichem Licht sei die Porendichte n_0 . Eine einzelne Pore öffne und schließe sich nach einer exponentiellen Kinetik mit den Zeitkonstanten k_1 und k_d (Offner 1972). Dann ist nach Ein- bzw. Ausschalten des Lichtes:

$$n(t) = n_0 (1 - \exp(-k_1 t)) \quad \text{und}$$

$$n(t) = n_0 (\exp(-k_d t))$$

Die mittlere Porendichte im periodisch unterbrochenen Licht kann dann durch eine Mittelwert - Berechnung bestimmt werden (siehe "Mathematischer Anhang" zu diesem Kapitel).

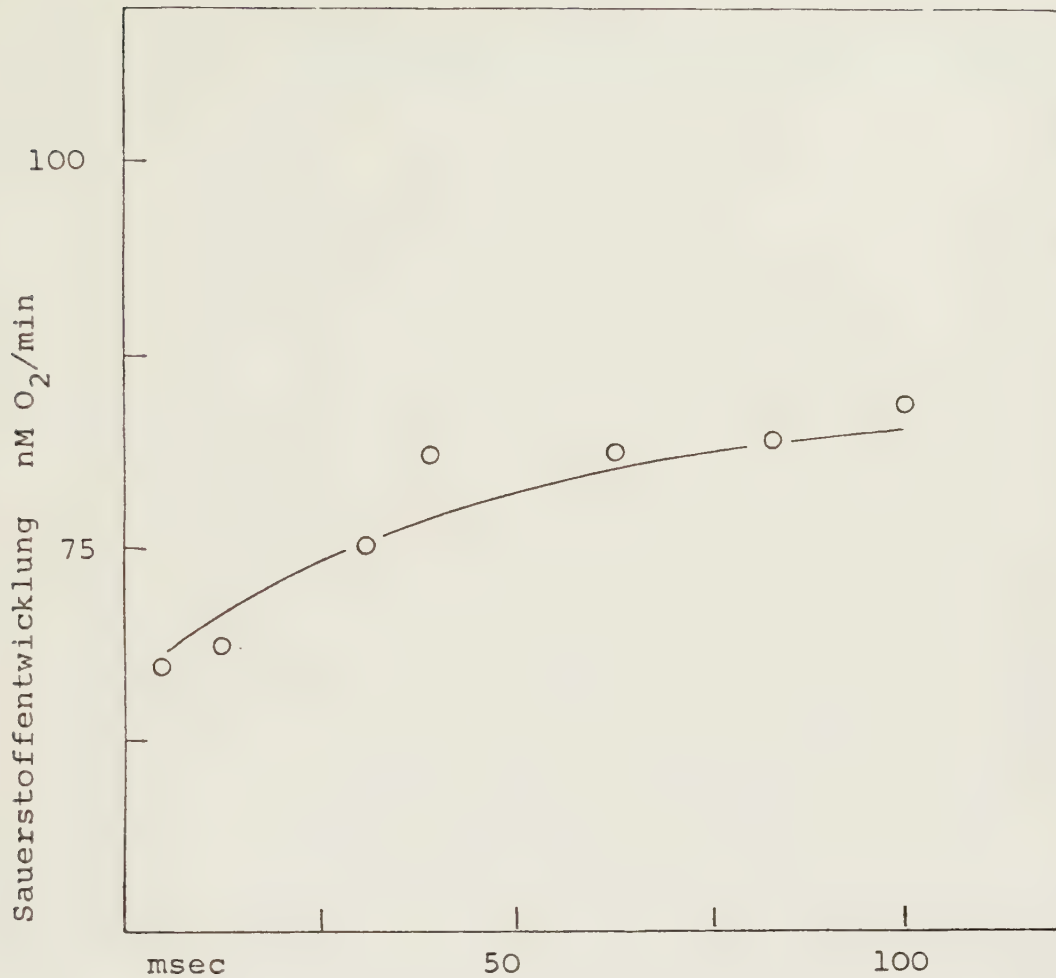


Abb.64

Sauerstoffentwicklung nach Cu(II)-Inhibierung bei periodisch unterbrochener Beleuchtung

geprüfte Reaktion $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fecy}$; 0,5 mM/L CuSO_4 , 2 mM/L Fecy; 1 min Lichtadaption bei entsprechender Rotorgeschwindigkeit; Inkubationszeit 5 min; Verhältnis von Licht- zu Dunkelphase 1 : 1 ; Chloroplasten wurden ohne Zusätze lichtinkubiert und vor der Messung mit 2,5 mM/L NH_4Cl entkoppelt. Kontrollwert der Sauerstoffentwicklung: 102 nM O₂/ min; nach Cu(II)-Inkubation in kontinuierlichem Licht: 33 nM O₂/ min.

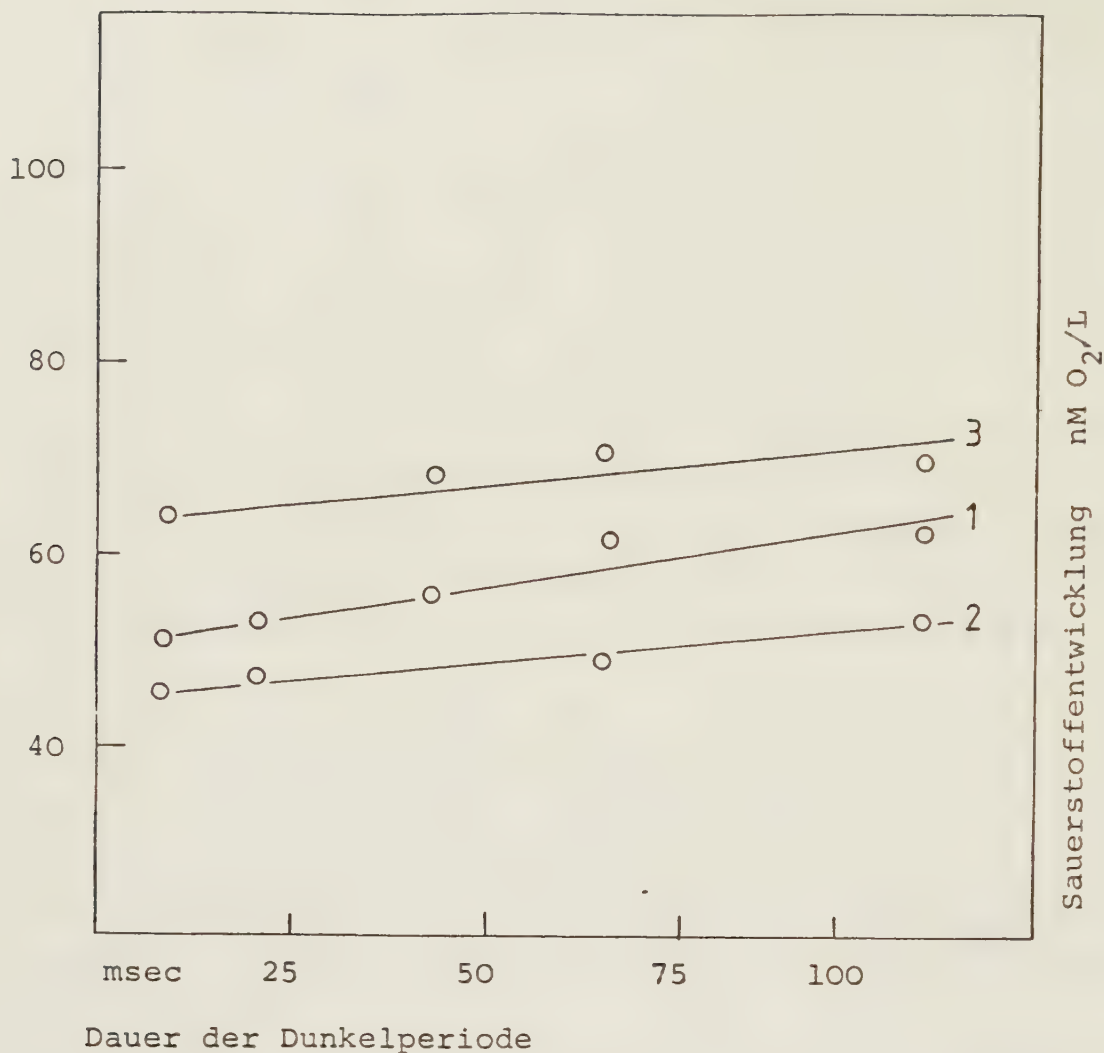


Abb.65

Sauerstoffentwicklung nach Cu(II)-Inhibierung bei periodisch unterbrochener Beleuchtung in der Gegenwart von Valinomycin und Gramicidin D

geprüfte Reaktion $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fecy}$; 0,5 mM/L CuSO₄, 2 mM/L Fecy; 1min Lichtadaption bei entsprechender Rotorgeschwindigkeit; Inkubationszeit 2,5 min; Verhältnis von Licht-zu Dunkelphase 1 : 17; Chloroplasten wurden ohne Zusätze lichtinkubiert und vor der Messung mit 2,5 mM/L NH₄Cl entkoppelt. Kontrollwert der Sauerstoffentwicklung: 98 nM O₂/min; nach Cu(II)-Inkubation im kontinuierlichen Licht: 39 nM O₂/min. Kurve 1: Chloroplasten ohne Zusätze, Kurve 2: + 0,01 mM/L Gramicidin D, Kurve 3: + 0,004 mM/L Valinomycin.

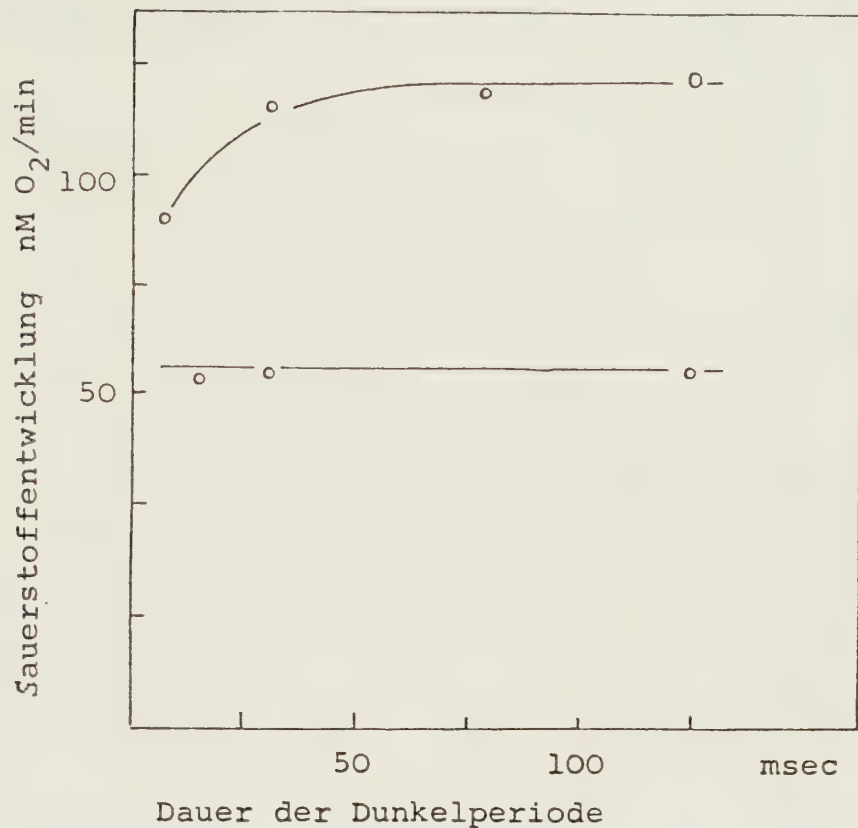


Abb. 66

Sauerstoffentwicklung nach Cu(II)-Inhibierung bei periodisch unterbrochener Beleuchtung in der Gegenwart von Valinomycin und Gramicidin D

obere Kurve : + Valinomycin; untere Kurve :
+ Gramicidin D

geprüfte Reaktion $\text{H}_2\text{O} \longrightarrow \text{Fecy}$; 0,5 mM/L CuSO_4 ; 2 mM/L Fecy; 1 min Lichtadaption bei entsprechender Rotorgeschwindigkeit; Inkubationszeit 5 min; Verhältnis von Licht- zu Dunkelphase 1 : 1; Kontrollwert der Sauerstoffentwicklung: + Valinomycin 145 nmol O₂/min, + Gramicidin D 191 nmol O₂/min; nach Cu(II)-Inkubation im kontinuierlichem Licht: 44 nmol O₂/min bzw. 5 nmol O₂/min.

Wie oben entwickelt, kann aus der Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung auf die Porendichte geschlossen werden.

Nach Gleichung (13) gilt dann

$$\frac{v_o - v_i}{v_o - v_k} = \frac{\bar{n}}{n_o}$$

und damit für $t_1 = t_d$:

$$\frac{v_i - v_k}{v_o - v_k} = \frac{k_d + k_1}{4} t_d \quad (14)$$

für 17 $t_1 = t_d$:

$$\frac{v_i - v_k}{v_o - v_k} = \frac{k_d}{2,1} + \frac{4k_1}{10^4} t_d \quad (15)$$

wobei v_o die Kontrollgeschwindigkeit der Sauerstoffentwicklung, v_k die nach Cu(II)-Inhibierung im kontinuierlichen Licht, und v_i die im periodisch unterbrochenen bezeichnet.

Mit Hilfe der Abb. (63) wurden k_1 und k_d graphisch bestimmt.

Die gleichen Experimente wurden in Gegenwart von Valinomycin und Gramicidin D durchgeführt. Diese Substanzen beschleunigen den Zusammenbruch des elektrischen Feldes nach Ausschalten des Lichtes erheblich (Witt 1979).

Die Abb. (65+66) zeigen die Meßwerte. Die Abhängigkeit der Inhibierung von der Phasenlänge ist in Gegenwart dieser Substanzen bei Zeiten 10 msec fast völlig verschwunden. Bei gleicher Phasenlänge ist im intermittierenden Licht die Inhibierung ca. 50 % der Inhibierung im kontinuierlichen Licht. Diese Daten eignen sich nicht für eine graphische Auswertung. Sie lassen aber den Schluß zu, daß die Halbwertszeiten der An- und Abklingprozesse in der Gegenwart dieser Substanzen erheblich verkürzt sind.

Tab.(68) zeigt die berechneten Halbwertszeiten

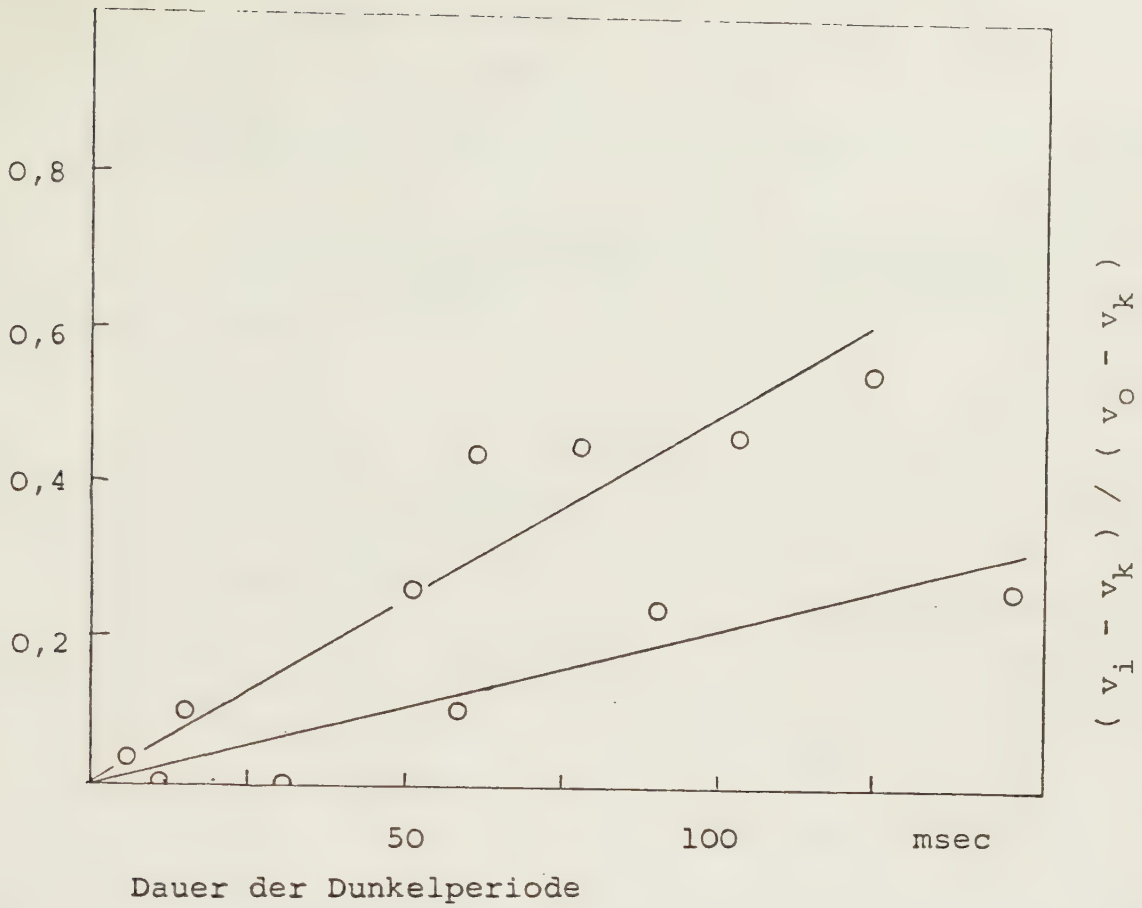


Abb. 67

Bestimmung der Geschwindigkeitskonstanten der Konformations-
änderung

Daten aus Abb. 65 + 66 berechnet nach Gleichung 14 + 15
Verhältnis von Licht- zu Dunkelperiode: obere Kurve 1 : 1 ,
untere Kurve 1 : 17.

Tab.68

Die Halbwertszeiten der Bildung und des Abbaus des
Cu - reaktiven Zustands nach einem einfachen Porenmodell

	Bildung	Abbau
	msec	
Chloroplasten ohne Zusätze	60 ± 10	180 ± 30
+ 0,01 mM/L Gramicidin D	< 10	
+ 0,004 mM/L Valinomycin		

Berechnet nach Gleichung (14) und (15) aus den Daten von
Abb. (60) und (61).

Mathematischer Anhang

Eine periodische Funktion $m(t)$ nehme im Intervall t_d mit

$$m(t) = m_0 \exp(-k_d t) \quad \text{ab}$$

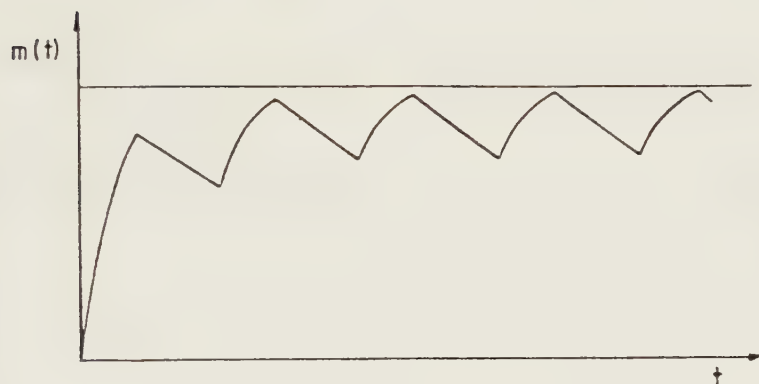
und im darauf folgenden Intervall t_1 mit

$$m(t) = m_0 (1 - \exp(-k_1 t)) \quad \text{zu.}$$

Die Periodenlänge Δt sei $t_d + t_1$, m_0 der Maximalwert. Für $k_1 t_1 > k_d t_d$ konvergiert die Funktion $m(t)$ gegen die periodische Funktion $n(t)$:

$$n_0 = n_{\max}(t) = n_{\max}(t + \Delta t)$$

$$n_{\min}(t) = n_0 \exp(-k_d t_d)$$



Der Fall $k_d t_d < k_1 t_1$ wird hier nicht betrachtet, da die Meßergebnisse sich mit ihm nicht erklären lassen. Zur Ableitung der Konvergenz siehe z.B. Meschkowski (1962).

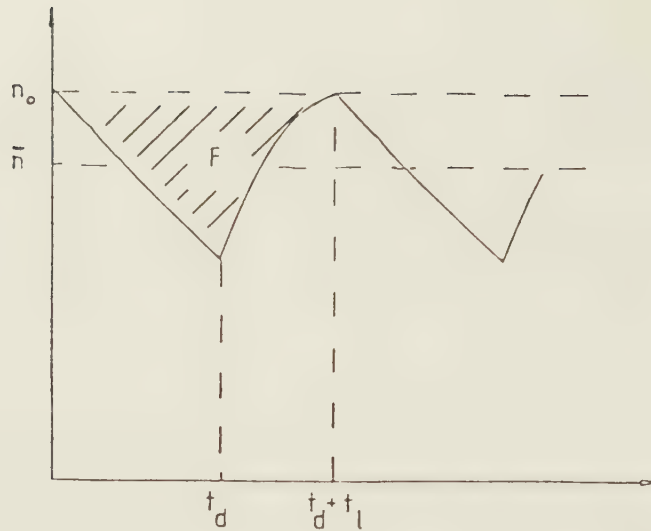
Das Problem besteht darin, den Mittelwert der periodischen Funktion $n(t_1, t_d)$ zu bestimmen.

Der Mittelwert kann bestimmt werden als

$$\bar{n} = n_0 - F / (t_d + t_1) \quad (\text{geometrisches Mittel})$$

wobei

$$F = n_0 (t_d + t_1) - \int_{t=0}^{t_d} n(t) dt - \int_{t_d}^{t_1+t_d} n(t) dt$$



Reihenentwicklung für die Exponentialfunktionen ergibt

$$\frac{n(t)}{n_0} = 1 - k_d t_d + \frac{k_d^2 t_d^2}{2} \pm \dots \quad \text{im Intervall } 0-t_d$$

$$\frac{n(t)}{n_0} = k_1 t_1 - \frac{k_1^2 t_1^2}{2} \pm \dots \quad \text{im Intervall } t_d-t_d+t_1$$

Unter Vernachlässigung von Potenzen höherer Ordnung ergibt die Flächenbestimmung

$$F = n_0 \frac{k_1 t_1^2 + k_d t_d^2}{2}$$

und damit gilt für den Mittelwert

$$\frac{\bar{n}}{n_0} = 1 - \frac{k_1 t_1^2 + k_d t_d^2}{2(t_d + t_1)}$$

für $t_d = t_1$ ergibt sich

$$\frac{\bar{n}}{n_0} = 1 - \frac{k_d + k_1}{4} t_d$$

für $t_d = 17 t_1$ ergibt sich

$$\frac{\bar{n}}{n_0} = 1 - \left(\frac{k_d}{2,1} + \frac{4k_1}{10^4} \right) t_d$$

VI) Bindung und Reduktion von Cu(II) durch die photosynthetische Membran

Da das zweiwertige Metallion Cu(II) in vielfältiger Weise mit den Bausteinen biologischer Membranen reagieren kann, wurde mit Hilfe der spektroskopischen Bestimmung des Cu(I)-Neocuproin-Komplexes Bindung und Reduktion verfolgt.

Tab.69 zeigt, daß Chloroplasten Cu(II) reduzieren, und daß die Reduktion im Wesentlichen von den Chloroplastenmembranen und nicht vom Stroma oder den Hüllen herrührt. Allerdings reduzieren auch Membranen Cu(II), deren Sauerstoff entwickelndes Enzymsystem durch Hitze deaktiviert ist.

Eine signifikante Differenz im Reduktionsvermögen durch Belichtung ist nur bei intakten Thylakoiden zu beobachten (Tab. 70). Eine exakte Untersuchung dieser Differenz ergibt eine zusätzliche Reduktion von $3,5 \mu\text{M/L}$ Cu(II) durch Belichtung während der Inkubation. Die Reduktionskinetiken zeigen allerdings einen wesentlich langsameren Verlauf als die Inhibierungs-kinetiken. (Abb. 74 + 75)

Zudem ist die Oxidation der Chloroplastenmembran durch Cu(II) in weitem Maßstab (85%) durch Waschen mit dem Inkubationspuffer reversibel. Waschen mit weiteren oxidierenden Reagentien wie DCIP und Fecy verringern die Fähigkeit zur Cu(II)-Reduktion (Tab.71), während eine Vorbehandlung mit DCMB ohne Einfluß bleibt. Die Inhibierung des Elektronentransportes kann jedoch durch diese Verfahren nicht rückgängig gemacht werden.

Auch die Bindung von Cu(II) wird im Wesentlichen von den Chloroplastenmembranen ausgeführt und ist unabhängig von der Integrität des Sauerstoff entwickelnden Enzymsystems und vom Elektronentransport von Photosystem II. Eine Licht-Dunkeldifferenz von $3,5 \mu\text{M/L}$ Cu(II) wurde gemessen. Allerdings nimmt die Fähigkeit zur Bindung von Cu(II) bei Belichtung ab (Tab.73).

Aus diesen Messungen ergibt sich folgendes Bild:

Nur ein Teil des zugegebenen Cu(II) wird von den Chloroplastenmembranen fest gebunden oder reduziert. An Reduktion und Bindung sind SH-Gruppen nur in geringem Maße beteiligt. Es befindet sich

noch vom Puffer oder den Membranen schwach gebundenes Cu(II) in der Suspension. Belichten der Membranen bewirkt eine zusätzliche Reduktion von 3,5 $\mu\text{M/L}$ Cu(II) und eine Verringerung der Bindung um dieselbe Konzentration.

Diese Konzentration ist jedoch zu hoch, als daß sie das inhibierend gebundene oder reduzierte Cu(II) darstellen könnte. Grob gerechnet entspricht sie 25 Cu(II)-Ionen pro Sauerstoff entwickelndes Enzymsystem. Es ist aber gezeigt worden, daß offensichtlich die Bindung eines einzelnen Cu(II)-Ions an eine spezifische Stelle die Inhibierung bewirkt.

Andererseits ist dieser Befund ein weiterer Hinweis auf die Konformationsänderung der Membran im Licht:

Offensichtlich wird nicht nur die Cu(II)-reaktive Stelle im Photosystem II im Licht zugänglich, sondern auch eine Reihe weiterer Gruppen, die mit Cu(II) reagieren, wird verdeckt oder zugänglich gemacht.

Dieser Effekt könne allerdings nicht weiter verfolgt werden, da er an der Empfindlichkeitsgrenze der Nachweismethode liegt.

Tab. 69

Reduktion von Cu(II) durch Chloroplasten

	$\mu\text{M/L Cu(I)}$		
	Dunkelin- kubierte	Lichtin- kubierte	Differenz
Class(II)-Chloro- plasten	15,2	14,5	-0,7
Thylakoiden	11,5	14,8	+3,3
Hitze-desaktivierte Chloroplasten	13,8	13,4	-0,4
Hitze-desaktivierte Thylakoiden	9,7	10,3	+0,6

12,5 $\mu\text{g/ml}$ Chlorophyll, 50 $\mu\text{M/L}$ CuSO_4 , Messung nach 30 min
Inkubation

Tab. 70

Reduktion von Cu(II) durch Thylakoiden

$\mu\text{M/L Cu(II)}$	$\mu\text{M/L Cu(I)}$		Differenz
	Dunkelin- kubierte	Lichtin- kubierte	
50	13,6	16,8	3,2
100	20,0	25,4	5,4
200	24,7	26,5	1,8
300	23,1	26,8	3,7

Daten wie Tab. 69

Tab. 71

Reduktion von Cu(II) durch vorbehandelte Chloroplasten

$\mu\text{M/L Cu(I)}$ ohne Behandlung	$\mu\text{M/L Cu(I)}$ behandelt mit	Verringerung der Reduktionsfähigkeit
28,5	CuSO_4 19,4	32 %
17,2	DCIP 6,9	60 %
9,9	Fecy 4,5	55 %

Die Chloroplasten wurden 10 min mit dem entsprechenden Reagenz im Dunkeln vorinkubiert und danach mit dem Inkubationspuffer einmal gewaschen.

Vorinkubation mit jeweils 1 mM/L des entsprechenden Reagenz. Messung der Cu(II)-Reduktionsfähigkeit mit 300 $\mu\text{M/L}$ CuSO_4 bei 0,1 mg/ml Chlorophyll.

Tab. 72

Bindung von Cu(II) an Chloroplasten

	$\mu\text{M/L Cu(II)}$		
	Dunkelin- kubierte	Lichtin- kubierte	Differenz
Class(II)-Chloro- plasten	15,0	11,6	3,4
Thylakoiden	11,4	9,6	1,8
Hitze-desaktivierte Chloroplasten	8,4	6,2	2,2
Hitze-desaktivierte Thylakoiden	6,4	3,4	3,0

12,5 $\mu\text{g/ml}$ Chlorophyll, 50 $\mu\text{M/L CuSO}_4$, Messung nach 30 min Inkubation

Tab. 73

Bindung von Cu(II) an Chloroplasten

	$\mu\text{M/L Cu(II)}$		
	Dunkelin- kubierte	Lichtin- kubierte	Differenz
Class(II)-Chloro- plasten	7,2	3,8	3,4

50 $\mu\text{g/L}$ Chlorophyll; Durchschnitt von 5 Messungen; weitere Daten wie Tab. 72

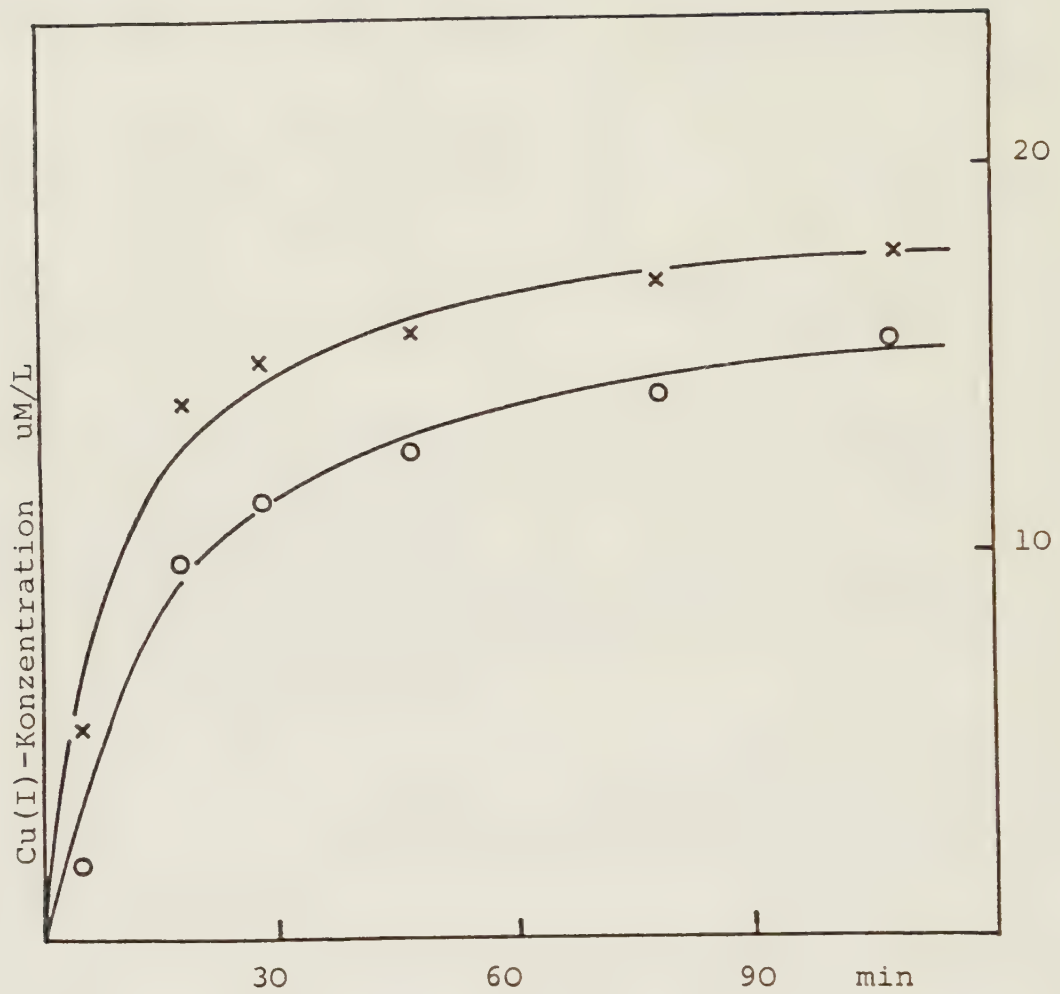


Abb. 74

Kinetik der Cu(II) -Reduktion in $\text{Class(II)} + \text{Chloroplasten}$ und in Thylakoiden im Licht . Daten wie Tab.71

- × $\text{Class(II)} - \text{Chloroplasten}$
- Thylakoiden

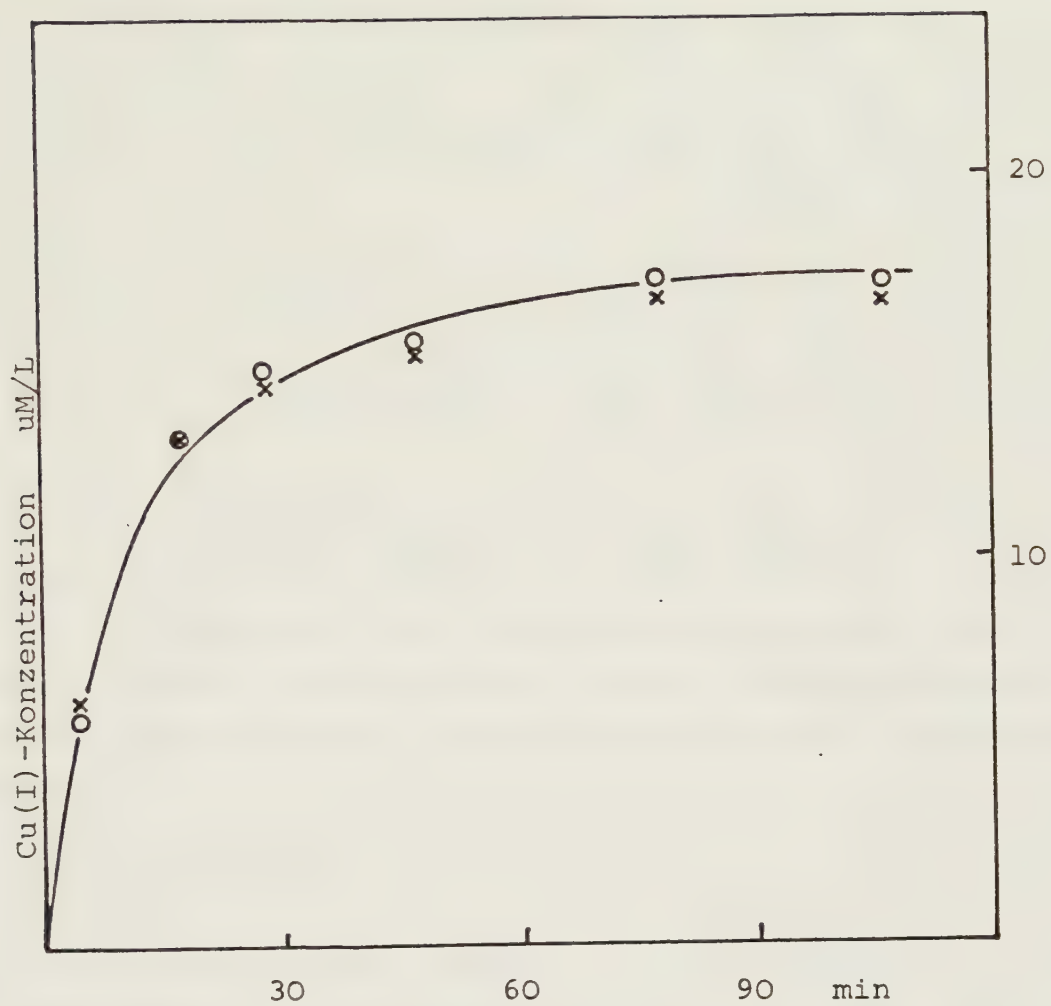


Abb. 75

Kinetik der Cu(II)-Reduktion in Class(II)-Chloroplasten und in Thylakoiden im Dunkeln. Daten wie Tab. 71

- × Class(II)-Chloroplasten
- Thylakoiden

Diskussion

I) Das Modell der Inaktivierung des Sauerstoff entwickelnden Enzymsystems

A) Der Mechanismus der Inhibierung

Eine der zentralen Fragen über den Mechanismus der Inhibierung lautet: Wird die Sauerstoffentwicklung durch eine elektrostatische Bindung mehrerer Cu(II) -Ionen an geladene Gruppen der Membran oder des Chlorophyll-Protein-Komplexes von Photosystem II unspezifisch inhibiert,

oder reagiert ein einziges Cu(II) -Ion mit einer spezifischen Gruppe einer bestimmten Komponente des Multienzymkomplexes gebunden und hemmt so dessen gesamte Aktivität?

Die erste Frage kann aufgrund früherer Arbeiten erheblich präziser gestellt werden:

Elektrostatische Wechselwirkungen zwischen fixierten geladenen Gruppen auf der Oberfläche der Membranen und verschiedenen Ionen im äußeren wässrigen Medium spielen eine wichtige Rolle: Sie beeinflussen die Arten und Wirksamkeiten von Reaktionen, die von der Membran ausgeführt werden. In den meisten Fällen werden sie mit Hilfe der Goy-Chapman-Theorie der diffusen Doppelschicht behandelt (Barber et al. 1977). Hind et al. (1969) und Heath (1969) zeigten, daß Cl^- benötigt wird für die Wasserspaltungsreaktion. Die Verteilung der Anregungsenergie zwischen den Photosystemen wird durch Kationen kontrolliert. Satoh et al. (1970, 1974) zeigten, daß die Photoreduktion von $\text{K}_3(\text{FeCn})_6$ verstärkt wird durch die Zugabe verschiedener Salze, und wiesen nach, daß auch die Stelle der Reduktion durch die Salz-Konzentration bestimmt wird. Außerdem ist bekannt, daß die Hillaktivität in starkem Maße vom physiologischen pH-Wert, der die Protonierung der Membran bestimmt, abhängig ist.

Bei physiologischem pH-Wert sind die Thylakoid-Membranen der Chloroplasten negativ geladen, wahrscheinlich durch die spezifische Lipid- und Protein-Zusammensetzung bedingt. Sie bilden eine diffuse elektrische Schicht, für die divalente Kationen die hauptsächlichsten Gegenionen darstellen. Allerdings ist nur die Netto-Oberflächenladung negativ, die Membranen enthalten gleichzeitig

Gruppen mit positiven und solche mit negativen Ladungen; bei physiologischem pH-Wert dominieren die negativen Ladungen. Itoh (1978) maß ein Oberflächenpotential von $-25 - -30$ mV gegen das äußere Medium. Dies entspricht einer Ladungsdichte von $1 e^-$ auf $12 - 22$ Chlorophyllmoleküle. Sie wird durch Na^+ - und K^+ -Ionen, vorzugsweise aber durch Mg^{2+} - und Ca^{2+} -Ionen elektrostatisch neutralisiert.

Die Adsorption einer chemischen Spezies kann die Situation der elektrochemischen Doppelschicht ändern, selbst in dem Sinne, daß sie Konformationsänderungen in den Makromolekülen induziert, die die Membran bilden. Änderungen in den repulsiven Kräften zwischen negativen Ladungen auf den Thylakoiden können funktionelle Gruppen für Wechselwirkungen zugänglich machen, die in der vorherigen makromolekularen Konformation nicht zugänglich waren. In diesem Sinne ist es vorstellbar, daß der Mechanismus der Inhibierung durch Cu indirekt ist, und auf einer unspezifischen Bindung an einer anderen Stelle als der Inhibierungsstelle beruht.

Tatsächlich wurde bei Zugabe von $CuCl_2$ eine Verringerung des Chloroplastenvolumens beobachtet (Dilley 1976).

Die Messung der Bindungs- und Reduktionskapazität der Membran unter verschiedenen Bedingungen sollte die Frage beantworten, ob es sich um einen unspezifischen Mechanismus handelt.

Die Anzahl der gebundenen Cu-Ionen liegt mit einem auf acht Chlorophyllmoleküle in der Größenordnung der Oberflächenladungsdichte (Barber et al. 1977). Im Licht reduziert sich ihre Zahl auf eine pro sechzehn Chlorophyllmoleküle. Da aber die Cu-Bindung ein Sättigungsverhalten zeigt, das sich von dem der Inhibierung um mehr als eine Größenordnung unterscheidet, kommt ein Zusammenhang kaum in Frage.

Die Reduktionskapazität der Membranen liegt bei einem Cu-Ion pro zwei Chlorophyllmoleküle. Sie läßt sich zu ca. 70 % durch einfaches Waschen mit dem Suspensionsmedium wiederherstellen. 60 % der Reduktionsstellen sind mit DCIP zu oxidieren, 55% mit $K_3(FeCN)_6$. Keines dieser Verfahren hat aber einen Einfluß auf die Inhibierung oder inhibiert selbst. Zudem zeigen die Reduktionskinetiken einen wesentlich langsameren Verlauf als die Inhibierungskinetiken. Allerdings erhöht sich die Reduktionskapazität der Membranen um ein Cu-Ion pro sechzehn Chlorophyllmoleküle durch Belichtung.

Diese Messungen zeigen, daß die inaktivierende Reaktion von Cu(II) direkt nicht meßbar ist; sie wird von Bindungs- und Reduktionsprozessen, die mit der Inhibierung nicht im Zusammenhang stehen, völlig verdeckt. Diese Reaktionen von Cu(II) beeinträchtigen die Sauerstoffentwicklung nicht, obwohl sie mit 10-20 gebundenen oder reduzierten Cu(II)-Ionen pro Enzymsystem ein beträchtliches Ausmaß annehmen. Die Zahl der an der Inaktivierung beteiligten Cu(II)-Ionen muß unter dieser Zahl liegen.

Dieses Ergebnis läßt jedoch die Frage- spezifisch oder unspezifisch- noch offen. Es mußte also auf eine andere Meßmethode zurückgegriffen werden.

Die Intensität der Lumineszenz von Photosystem II im Zeitbereich von Mikrosekunden bis Millisekunden ist ein sehr sensibler Indikator des Zustandes des Sauerstoff entwickelnden Systems (Zankel 1971, Velthuys 1975, Review-Arbeiten von Lavorel 1975, Malkin 1977).

Daher ist zu erwarten, daß die Inaktivierung des Sauerstoff entwickelnden Enzymsystems sich spiegelt in der Abklingkinetik der Lumineszenz. Diese ist gewöhnlich von komplexer Ordnung, da weitere Faktoren modulierend wirken.

Es konnte nun gezeigt werden, daß zwar die Intensität der Lumineszenz im Bereich von 50 μ sec-1,5 msec durch die Cu(II)-Inhibierung abnimmt, die Form der Abklingkinetik sich aber nicht ändert.

Dies ist ein starkes Argument dafür, daß die Lumineszenz nur von solchen Photosystemen kommt, die intakt geblieben sind, während die inaktivierten nicht zur Lumineszenz beitragen.

Das bedeutet weiter, daß keine Photosysteme existieren, die nur teilweise inaktiviert sind.

Ein derartiges Ergebnis ist aber unvereinbar mit der Vorstellung einer Inaktivierung durch mehr als ein Cu(II)-Ion. Schon wenn zwei Ionen zur Inhibierung notwendig wären, wegen zu geringer Cu(II)-Konzentration im Puffer aber nur eines gebunden werden kann, müßten Photosysteme mit verminderter Aktivität existieren, und sich dies in der Abklingkinetik auswirken. Dies wird aber nicht beobachtet.

Nach diesem Ergebnis wurde als sicher angenommen, daß die Bindung eines einzelnen Cu(II)-Ions an eine spezifische

Stelle einer Komponente zur Inhibierung der Sauerstoffentwicklung führt: Nach der Bindung eines Cu(II)-Ions kann das betroffene Photosystem weder Sauerstoff entwickeln, noch zur Lumineszenz beitragen.

In einer vorangegangenen Arbeit (Vierke und Struckmeier 1978) ist gezeigt worden daß die Inhibierung erklärt werden kann mit der Bindung eines Cu(II)-Ions an ein dissoziiertes Protein.

Aus den Gleichgewichtswerten der bei bestimmten Cu(II)-Konzentrationen erreichten Inhibierung der Sauerstoffentwicklung wurden die Bindungsdaten bestimmt. Diese Werte stimmen mit denen überein, die aus der Inhibierung der Lumineszenz gewonnen wurden.

Diese Übereinstimmung ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die Inhibierung durch die Bindung eines einzelnen Cu(II)-Ions an eine spezifische Stelle einer Komponente zustande kommt.

B) Die SH-Gruppen-Hypothese

J.A.Swader et al. (1972,1974,1975) zeigten, daß Cu(II)-Ionen Wachstum und Photosynthese der Alge *Chlorella* hemmen, sowie die Sauerstoffentwicklung zerstören. Sie vermuteten, daß die hemmende Wirkung von einer Reaktion der Ionen mit Sulfhydrylgruppen herrührt.

Gegen diese These spricht eine Reihe von Ergebnissen:

Die Bindungskonstanten von Komplexen zwischen SH-Gruppen und Cu(II) liegen in der Größenordnung von $pK_M = 19 - 20$, die Dissoziationskonstante ist mit $pK_a = 9 - 10$ relativ hoch (Vallee, Wacker 1970).

Es konnte gezeigt werden, daß im vorliegenden System die bindende Gruppe mit einer Konstante von $pK_a = 6,4$ dissoziiert, und daß der dissoziierte Rest Cu(II) mit einer Bindungskonstante von $pK_M = 5,3$ bindet. Diese Daten sprechen klar gegen einen solchen Effekt.

Weiterhin sind derartige Bindungen meist reversibel und die hemmenden Effekte können durch Zugabe von SH-Verbindungen wie z.B. Dimercaptopropanol oder Dithioerythritol reduziert werden (C.S.Andreo et al. 1976). Derartige Versuche blieben aber bei der Cu(II)-Inhibierung der Sauerstoffentwicklung ohne Erfolg.

Denkbar ist auch eine Oxidation von SH-Gruppen unter Bildung von Disulfidbrücken; diese Wirkung von Cu(II) wurde an Erythrozytenmembranen demonstriert (J.M.Salhany et al. 1978).

In solchen Prozessen wirkt Cu(II) katalytisch, und es wurden wie im vorliegenden System Kinetiken nullter Ordnung beobachtet (P.Hemmerich 1966). Gegen diese Interpretation sprechen zwei Gründe: Die Inhibierung der Sauerstoffentwicklung benötigt mehrere Minuten, während sonst die Oxidation von membrangebundenen SH-Gruppen innerhalb von Sekunden vollständig beendet ist (Peters,Richards 1977). Weiterhin sind Kinetiken nullter Ordnung nur zu erwarten, wenn die Cu(II)-Konzentration klein ist gegen die SH-Gruppen-Konzentration. Dies ist aber in den vorgelegten Experimenten nicht der Fall. Stärkstes Argument aber gegen die These einer Reaktion mit SH-Gruppen liefern aber eine Reihe von Arbeiten, die mit SH-Reagentien an Chloroplasten unternommen wurden:

So reagiert Hg(II) gewöhnlich wesentlich stärker mit SH-Gruppen als Cu(II). Trotzdem haben Quecksilberverbindungen wie HgCl_2 oder p-Chlorquecksilberbenzoat keinerlei hemmenden Einfluß auf die Sauerstoffentwicklung, selbst bei Konzentrationen von 1 mM/L (Izawa, Good 1969; Miles et al. 1973). Auch andere SH-Reagentien wie N-Äthylmaleimid oder das sehr spezifisch wirkende o-Iodosobenzoat haben keine Wirkung (McCarty 1972, Vallejos und Andreo 1976). Aufgrund dieser Ergebnisse ist anzunehmen, daß die hemmende Wirkung von Cu(II) auf die Sauerstoffentwicklung nicht auf eine Reaktion mit SH-Gruppen zurückzuführen ist. Die Messungen von J.A. Swader et al. (1974, 1975) sind eventuell auf eine Reaktion von Cu(II) mit SH-Gruppen zurückzuführen, die in keinem Zusammenhang mit der Sauerstoffentwicklung stehen.

II) Die Lokalisierung der inaktivierten Komponente

Die Stelle der Inhibierung ist bisher auf der oxidierenden Seite von Photosystem II vermutet worden. Sie konnte im Verlauf dieser Arbeit durch den Vergleich der Ergebnisse mehrerer Methoden exakter bestimmt werden.

Das Reaktionszentrum von Photosystem II bleibt völlig intakt; dies konnte durch Lumineszenz- und Fluoreszenzuntersuchungen belegt werden. Die Reduktion von Z_1 durch Mn(II) (Govindjee 1977), zeigte sich resistenter gegen Cu(II) als die Photooxidation von DPC oder Benzidin, die von Z_2 ausgeführt wird (Trebst 1974). Dieses Ergebnis beruht auf der Untersuchung von Teilsequenzen des Elektronentransportes und wurde durch weitere Lumineszenzmessungen erhärtet, da Cedeno-Maldonado und Swader (1972) abweichende Resultate veröffentlicht hatten.

Auf der oxidierenden Seite von PSII ist bisher keine einzige Komponente biochemisch identifiziert oder auch nur ausreichend charakterisiert worden, selbst über die Zahl der Komponenten besteht keine gesicherte Erkenntnis und ebensowenig über den Zusammenhang der S-Zustände mit Z_1 oder Z_2 . Daher führt auch das aus der Temperaturabhängigkeit der Lumineszenz gewonnene Ergebnis nicht weiter: Cu(II) inhibiert am ehesten S_4 oder den Übergang $S_4 \rightarrow S_0$, bei dem das O_2 -Molekül freigesetzt wird. Zudem ist dieses Ergebnis nicht als sehr sicher anzusehen, da die zugrundeliegende Theorie der Thermolumineszenz von Ioune et al. (1976, 1978) noch wenig überprüft ist.

Somit bleibt die Aussage über die Stelle der Elektronentransportkette, an der die betroffene Komponente sitzt, die präziseste.

Allerdings ist eine weitere Schlußfolgerung als gesichert anzunehmen:

Die inhibierte Komponente befindet sich in einer Region der Membran, die bevorzugt von lipophilen und schlecht von hydrophilen Reagentien erreicht wird (Trebst 1974).

Ein weiteres Experiment bestätigte diese Schlußfolgerung: In der Gegenwart von Äthanol wird die Inhibierung erheblich beschleunigt.

III) Die Diffusion der Cu(II)-Ionen an die Bindungsstelle

Das Ergebnis, daß die Stelle der Inhibierung für hydrophile Reagentien schlecht zu erreichen ist, macht einen Diffusionsansatz zur Erklärung der kinetischen Daten notwendig. Zudem stellt das elektrische Feld über die Membran für Cu(II)-Ionen eine Potentialbarriere dar, durch die diese diffundieren müssen.

Dieser Prozeß wird durch eine partielle nichtlineare Differentialgleichung beschrieben. Es wurde ein Näherungsansatz gemacht, der die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten größenordnungsmäßig erlaubt.

Es konnte gezeigt werden, daß die kinetischen Daten mit dieser Näherung approximiert werden können.

Die komplexe Abhängigkeit der Inhibierungskinetik von der Cu-Konzentration, dem pH-Wert, der Temperatur und der Belichtung kann erklärt werden durch eine diffusionsgekoppelte Bindung eines Cu(II)-Ions an ein Protein, das dadurch inaktiviert wird.

Mit dem experimentell bestimmten Diffusionskoeffizienten kann die mittlere Cu(II)-Konzentration in der Membran in Abhängigkeit von der Zeit und der äußeren Konzentration berechnet werden. Bei völliger Inhibierung beträgt sie gerade ein Ion auf $2000-4000 \text{ \AA}^2$. Dies ist genau die Fläche, die von elektronenmikroskopisch nachgewiesenen Partikeln in der Membran eingenommen wird, und die die Chlorophyll-Protein-Komplexe der Photosysteme darstellen sollen (Miller et al. 1976).

Dieses Resultat zeigt die Konsistenz des Modells.

Nach den Grundgleichungen der Theorie der Elektrodifffusion (Offner 1972) kann eine obere Grenze für die Potentialbarriere berechnet werden, die das elektrische Feld darstellt; je nach Feldgröße im kontinuierlichen Licht und je nach der Weglänge des Cu(II)-Ions gegen das Feld liegt die Potentialbarriere zwischen 1 und 8 kJ/M.

Auch die Diffusionsbarriere, deren Größe der experimentell bestimmte Diffusionskoeffizient angibt, kann gemäß den Gleichungen der Thermodynamik der Diffusion (Offner 1972)

ausgedrückt werden als Potentialbarriere: Je nach Diffusionsweg liegt sie zwischen 5 und 9 kJ/M.

Aufgrund dieser Berechnung liegt die Potentialbarriere des gesamten Diffusionsprozesses unter 10 kJ/M.

Diese Zahlenwerte erlauben Spekulationen über den Mechanismus der Diffusion:

Es ist unwahrscheinlich, daß das Cu(II)-Ion in die Lipidmembran eindringt: Es wäre ein Energieaufwand von ca. 100 kJ/Mol nötig, um die Hydrathülle des Ions abzustreifen.

Die Berechnung zeigt, daß allein schon die Potentialbarriere, die das elektrische Feld darstellt, in der Größenordnung der experimentell bestimmten Diffusionsbarriere liegt.

Denkbar ist auch, daß das Cu(II)-Ion mit einem Phospholipidmolekül einen neutralen Komplex bildet und so an die Bindungsstelle diffundiert. Derartige Komplexe wurden in vitro nachgewiesen (Puskin 1977), ihre ESR-Parameter differieren nicht wesentlich von denen, die in einer vorhergehenden Studie in Chloroplasten nachgewiesen wurden. (Vierke und Struckmeier 1977). Phospholipide stellen 15-20 % der Lipide der Chloroplastenmembran (Nishihara et al. 1980). Außerdem liegt der empirisch bestimmte Diffusionskoeffizient in der Größenordnung der Diffusionskoeffiziente von Lipiden in Membranen (M. Edidin 1974).

Diese Hypothese wurde experimentell und theoretisch nicht weiter verfolgt, besitzt aber durchaus einen gewissen Grad von Wahrscheinlichkeit.

IV) Die Lichtaktivierung des Cu-reaktiven Zustands

Außer den Fragen nach der inhibierten Komponente und dem Mechanismus des Inhibierungsprozesses ist von besonderem Interesse, warum die Inhibierung nur im Licht auftritt. Die Beantwortung dieser Frage sollte Aufschlüsse geben über Reaktionen, die mit der Sauerstoffentwicklung verbunden sind. Zunächst wurde untersucht, ob der Cu-reaktive Zustand auf

- a) einer Photooxidation der betroffenen Komponente,
- b) einer pH-induzierten Konformationsänderung der betroffenen Komponente,
- c) einer Konformationsänderung der Membran beruht.

Die beiden ersten Möglichkeiten konnten zweifelsfrei ausgeschlossen werden:

Es wurde gezeigt, daß schon die Anregung von Photosystem I den Cu-reaktiven Zustand herstellt, dabei wird keine Komponente von Photosystem II photooxidiert. Der Cu-reaktive Zustand ist weitgehend unabhängig davon, ob pH-Änderungen im Innern der Membran auftreten.

Schließlich konnte nachgewiesen werden, daß auch im Dunkeln eine Inhibierung zu erreichen ist, wenn die Membranen in der Gegenwart von Cu(II) in der Zentrifuge Beschleunigungen von 1000g ausgesetzt werden.

Daraus wurde geschlossen, daß dem Cu-reaktiven Zustand eine Konformationsänderung zugrunde liegt.

Auch die verminderte Cu(II)-Bindungsfähigkeit der Membran in Licht, sowie ihre erhöhte Reduktionsfähigkeit spricht dafür, daß die Membran eine Konformationsänderung bei Belichtung ausführt, die bindende oder reduzierende Gruppen maskiert oder freisetzt.

Es wurde weiter versucht, Informationen über die Ursache der Konformationsänderung zu gewinnen. Da auch Photosystem I die Konformationsänderung erzeugt, die Photosysteme aber separate Einheiten von 100-200 Å Durchmesser sind, muß es sich um weitreichende Kräfte handeln.

Hierfür kommt neben den photosynthetischen Redoxreaktionen der elektrochemische Potentialgradient in Frage. Da weder

der Elektronentransport, noch der pH-Gradient den Cu-reaktiven Zustand erzeugt, bleibt das elektrische Feld die wahrscheinlichste Ursache für die Konformationsänderung. Drei indirekte Hinweise wurden gefunden. Der Bruchteil der inhibierten Photosysteme ist proportional zum Bruchteil der Zentren, die ein elektrisches Feld über die Membran aufspannen. Die Kräfte, die vom elektrischen Feld auf die Membran ausgeübt werden, liegen in der Größenordnung von denen, die während der Zentrifugation auftreten.

Die Halbwertszeit des Cu-reaktiven Zustands nach kurzen Lichtblitzen wurde mit einem einfachen Porenmodell berechnet, sie liegt mit 280 sec in der Größenordnung der Halbwertszeit des elektrischen Feldes (Witt 1979) und wird ebenfalls durch Zugabe von Gramicidin D oder Valinomycin erheblich beschleunigt. Allerdings kann mit diesen Hinweisen der Zusammenhang von Konformationsänderung und elektrischem Feld noch nicht als sicher angenommen werden. Derartige Prozesse wurden an künstlichen Membranen (Sachmann 1979, Schwarz 1978, Lenaz, Curatola 1975) schon nachgewiesen und theoretisch behandelt.

Eine Reihe von Arbeiten, die sich mit Konformationsänderungen der Chloroplastenmembran befassen, weisen makroskopische Strukturänderungen nach, die im Sekundenbereich verlaufen, und die daher für einen Zusammenhang mit den hier diskutierten Vorgängen kaum in Frage kommen (Packer, Murakami 1972, Gross und Libbey 1972, Krause 1974, Prochaska und Gross 1977)!

Eine Konformationsänderung der Membran, die im Zusammenhang mit der Sauerstoffentwicklung entsteht, wurde von Dilley und Mitarbeitern (1975, 1976, 1978) beschrieben. Sie wiesen nach, daß diese Konformationsänderung erzeugt wird durch

a) Elektronentransport zwischen dem primären Akzeptor von Photosystem II, Q, und dem Plastochinonspeicher oder durch

b) hohe Salz-oder pH-Gradienten.

Für die Bildung des Cu(II)-reaktiven Zustands ist aber weder ein Elektronentransport noch ein chemischer Gradient über die Membran notwendig. Daher muß es sich um einen anderen Mechanismus von Konformationsänderung als den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen handeln.

Kobayashi und Mitarbeiter (1976, 1977) berichteten ebenfalls von einer lichtinduzierten Konformationsänderung, die die oxidierende Seite von Photosystem II exponiert. Ihre Lebenszeit im Dunkeln liegt mit 230 msec in der Nähe der hier beobachteten. Allerdings wird auch diese Konformationsänderung durch Zugabe von DCMU verhindert, ein Effekt, der beim Cu-reaktiven Zustand nicht beobachtet werden konnte. Offensichtlich kann die Konformationsänderung der Membran, die im Rahmen dieser Arbeit charakterisiert wurde, mit keiner der bisher beschriebenen in Zusammenhang gebracht werden.

Zusammenfassung

In zwei vorausgegangenen Studien wurde gezeigt, daß die Inaktivierung der Sauerstoffentwicklung erklärt werden kann mit der Bindung von Cu(II) an eine Komponente auf der oxidierenden Seite von Photosystem II, und es wurde ESR-spektroskopisch ein derartiger Komplex nachgewiesen, der möglicherweise die inaktivierte Komponente darstellt.

Die vorliegende Arbeit liefert eine Reihe weiterer Daten, die ein modifiziertes und vertieftes Bild des Inhibierungsmechanismus erlauben, und untersucht insbesondere die Frage, warum Cu(II) die Sauerstoffentwicklung nur bei Belichtung zerstört, nicht aber im Dunkeln.

Für diese Messungen wurde ein hochempfindliches Laser-Phosphoroskop mit digitaler und analoger Datenverarbeitung konstruiert und entwickelt. Es kann auch für Fluoreszenzmessungen verwendet werden, und erlaubt Probentemperaturen bis 77°K. Weiterhin wurde eine Anlage zur polarographischen Messung der Sauerstoffentwicklung gebaut, die eine monochromatische Bestrahlung der Probe und Variation ihrer Temperatur ermöglicht.

Es wurde geprüft, ob die Hemmung der Sauerstoffentwicklung auf einer unspezifischen Reaktion vieler Cu(II)-Ionen mit der Membran beruht. Diese Möglichkeit schien gegeben, da das Enzymsystem sehr labil ist und eine Reihe von milden Verfahren schon seine Zerstörung bewirkt. Die Messungen wiesen aber darauf hin, daß die Bindung eines einzelnen Cu(II)-Ions an eine Komponente die Inaktivierung bewirkt.

Weitere Messungen ergaben, daß Cu(II) von einer funktionellen Gruppe, die mit einem pK_a von 6,4 dissoziiert, mit einer Bindungskonstante pK_M von 5,3 gebunden wird.

Die Hypothese von Cedeno-Maldonado et al. (1972), daß es sich um eine Reaktion von Cu(II) mit SH-Gruppen handelt, konnte nicht bestätigt werden.

Die inhibierte Komponente befindet sich offenbar in einer lipophilen Region der Membran, zwischen den Donoren Z_1 und Z_2 von Photosystem II. Für die Diffusion der $Cu(II)$ -Ionen an diese Stelle wurde ein Diffusionskoeffizient von $10^{-8} [cm^2 sec^{-1}]$ bestimmt.

$Cu(II)$ inaktiviert die Sauerstoffentwicklung nur im Licht, soweit bisher bekannt. Es wurde nachgewiesen, daß diesem Effekt eine reversible Konformationsänderung der Membran im Licht zugrunde liegt. Diese Konformationsänderung macht die entsprechende Komponente für $Cu(II)$ zugänglich. Es wurde weiter untersucht, welche physiologischen Membranprozesse der Konformationsänderung zugrunde liegen.

Während die Bindung eines einzelnen $Cu(II)$ -Ions an eine spezifische Komponente für die Inhibierung verantwortlich zu sein scheint, exponiert die Konformationsänderung 8 - 10 weitere $Cu(II)$ -reduzierende Gruppen pro Photosystem II und verdeckt etwa die gleiche Zahl $Cu(II)$ bindender Gruppen. Es konnte gezeigt werden, daß sie im Gegensatz zu anderen, bisher bekannten Konformationsänderungen der Membran unabhängig vom pH-Gradienten sowie vom Elektronentransport ist. Es wurden mehrere Hinweise dafür gefunden, daß sie vom elektrischen Feld über die Membran, das durch die primäre photochemische Ladungstrennung entsteht, ausgelöst wird. Es wurde nachgewiesen, daß die Konformationsänderung auch ohne Licht durch die Beschleunigungskräfte einer Zentrifugation hergestellt werden kann.

Literaturverzeichnis

- Arnon, D.I. (1949) Plant Phys.24, 1 - 15
- Arntzen, C.J., P.A.Armond, C.S.Zettinger, C.Vernotte, J.M.
Briantais (1974) BBA 347, 329 - 339
- Babcock, G.T., K.Sauer (1975) BBA 396, 48 - 62
- Barber, J. in "Membrane Transports in Plants" (1974) ed. U.
Zimmermann, J. Dainty, 297
- Barber, J., J.Mills, A. Love FEBS Lett. 74,2 (1977) 174-181
- Berecki-Biedermann, C. (1956) Arkiv Kemi 9,16 175-189
- Bishop, D.G. (1974) PPB 20, 281
- Bisswanger, H. (1979) "Theorie und Methoden der Enzymkinetik"
Weinheim
- Blankenship, R.E., K.Sauer (1974) BBA 357, 252 - 266
- Boyer, P.D., R.L. Cross, W.Momsen (1973) Proc. Natl. Acad. Sci.
USA 70, 2837 - 2839
- Breslow, E., F.R.N.Gurd (1963) J.Biol.Chem. 283, 1332
- Bulychev, A.A., W.J.Vredenberg (1970) BBA 423, 548 -566
- Burber J., J.Mills (1976) FEBS Lett. 68, 288 - 292
- Cannellakis, E.S., G.Akoyunoglou (1976) BBA 440, 163 - 175
- Cedeno-Maldonado A., J.A.Swader, R.L.Heath (1972) Plant Phys.
50, 698 - 701
- Crank, J., G.S.Park (1968) "Diffusion in Polymers" London
- Crank, J. (1975) "The Mathematics of Diffusion" London
- Deamer, D.W. Crofts, A.R. Packer, L. (1967) BBA 131, 81 - 96
- Deamer, D.W. (ed.) (1978) "Light Transducing Membranes" New York
- Dilley, R.A., Vernon, L.P. Proc. Natl. Acad. Sci. US 57, 395-400
- Dilley, R.A. (1966) Brookhaven Symp.19, 258-280
- Dilley, R.A., A.Rothstein (1967) BBA 135, 427 - 433
- Dilley, R.A. Curr.Top.Bioenerg.4 (1971) 237-271
- Dilley, R.A., R.T.Giaquinta (1975) Curr.Top.Membr.Transp.7
(eds) F.Bronner, A.Kleinzeller
- Eddidin, M. (1974) Ann.Rev.Biophys.Bioeng.3, 179-201
- Edsall, J.T. in "Ion Transports across Membranes" (1954)
(ed.) H.T.Clark New York
- Friedberg, F. (1974) Quart. Rev. Biophys.7,1 1 - 33
- Gläser, M., C.Wolff, G.Renger (1976) Z.Naturf. 31c, 712 - 21
- Goldmann, D.E. (1964) Biophys.J.4, 167-168

- Good, E., G.D. Winget, W. Winter, Th.N. Conolly, S. Izawa, R.M.M. Singh (1966) *Biochem.* 5, 2 467 - 477
- Gross, E.L., L. Packer (1967) *Arch. Biochem. Biophys.* 121, 779-789
- Gross, R.E., P. Pugno, W.M. Dugger (1970) *Plant Phys.* 46, 183-185
- Gross, E.L., J.W. Libbey (1972) *Arch. B.B.* 153, 457 - 467
- Gross, E.L., S.H. Prasher (1974) *Arch. Biochem. Biophys.* 164, 460 - 468
- Habermann, H.M. (1968) *Plant Physiol.* 44, 331
- Heath, R.L., G. Hind (1969) *BBA* 172, 290-299
- Hemmerich, P. in "The Biochemistry of Copper" ed. J. Peisach, Ph. Aisen, W.E. Blumberg (1966) New York
- Hille, B. (1969) *Progr. Biophys.* 21, 1-32
- Hind, G., H.T. Jagendorf (1965) *J. Biol.* 240, 3202 - 3209
- Hind, G. H.Y. Yakatami, S. Izawa (1967) *Proc. Natl. Acad. Sci. US* 71, 1484-1488
- Hind, G. H.Y. Nakatami, S. Izawa (1969) *BBA* 172, 277-289
- Hirose, S., Y. Tamawa, K. Iida, Y. Inada (1973) *BBA* 305, 52 - 58
- Hochster, R.M., J.H. Quastel in "Metabolic Inhibitors" Vol III (1963) New York
- Hodgkin, A.L., Huxley, A.F. (1952) *J. Physiol.* 117, 500-544
- Inoue, Y., Furuta, S., T. Oku, K. Shibata (1976) *BBA* 449, 357-367
- Inoue, Y. (1976) *FEBS Lett.* 72, 279-282
- Inoue, Y., Shibata, K. (1978) *FEBS Lett.* 85, 2 193-197
- Itoh, S., N. Murata (1973) *PPB* 18, 205-218
- Itoh, S. (1978) *P.C. Phys.* 19, 1 149 - 166
- Izawa, S., N.E. Good in "Progress in Photosynth. Research." H. Metzner (ed.) (1969) Tübingen
- Jursinic, P., Govindjee (1977) *BBA* 461, 253-267
- Jursinic, P., Govindjee, C.A. Wraight (1978) *PPB* 27, 61 - 72
- Katchalsky, A., Zwick, M. (1955) *J. Polym. Sci.* 16, 221-234
- Kirk, J.T.O. (1971) *Ann. Rev. Biochem.* 40, 169-196
- Kirk, J.T.O. (1971) *Proc. II Ind. Int. Cong. Photosynth. Stresa* 2333-2347
- Klotz, I. in "The Proteins (1953) Vol. I, B, ed. Neurath, Bailey
- Kobayashi, Y., Y. Inoue, K. Shibata (1976) *BBA* 423, 80-90
- " " " (1976) *BBA* 440, 600-608
- " " " (1977) *Plant Cell Phys.* 18, 453
- Krause, G.H. (1974) *BBA* 333, 301-313

- Kuhn,W., A.Ramel, D.H.Walters, G.Ebner, H.J.Kuhn Fortschr.
Hochpolym.Forsch.1 (1960) 540-592
- Lavorel,J.(1968) BBA 153, 727-730
- Lenaz.J., G.Guratola (1975) J.Bioenerg.7,223-229
- Kok,B., B.Forbush,McGloin,M.(1960) PPB 11,457-475
- Malkin,R., A.J.Bearden (1975) BBA 396, 250 - 259
- Malkin,S.)1977) in "Primary Processes of Photosynth." ed.
J.Barber 349-431 Amsterdam
- Meschkowski,H. (1962) 'Unendliche Reihen' Mannheim
- Mandelkern,L., (1967) J.Gen.Physiol.50, 29 - 60
- Mathis,P., A.Vermeglio (1974) BBA 368 130-134
- McDowall,F.D. (1949) Plant Physiol. 24, 464
- McLilley,R., M.P.Fitzgerald, K.G.Rienits, D.A.Walker
(1975) New Phytol.75, 1-10
- Miller,K.R., G.J.Miller, K.R.McIntyre J.Cell Biol.71 (1976)
624-638
- Mitchell,P. (1976) Biochem.Soc.Trans.4, 399-430
- Murakami,S., L.Packer (1974) J.Cell Biol.47,332-351
- Nakatami,H.Y., J.Barber, M.J.Minski (1979) BBA 545, 24-35
- Nishihara,M., M.Yokato, M.Mito (1980) BBA 617, 1-22
- Offner,F. (1972) Biophysical Journal 2, 1583-1629
- Ohki,S. in"Phys.Princ.Biol.Membr."(1968) eds. F.Snell, J.Walker,
G.Iverson, J.Lam New York
- Packer, L., S.Murakmi in "Methods in Enzymol.24" (1972) 181-205
- Papageorgiou,G. in "Bioenergetics of Photosynth." (1975)
ed.Govindjee New York
- Perutz,M.F. (1979) Ann.Rev.Biochem. 48
- Prochaska,L.J., E.L.Gross (1977) J.Membr.Biol.36, 13-22
- Puskin,J.S. (1977) J.Membr.Biol.35,39-55
- Roche,T.S., R.G.Wilkins J.Am.Chem.Soc.96,16 (1974) 5082-5086
- Sackmann,E. in "Light Induced Charge Separation in Biology
and Chemistry" (1979) Berlin eds. H.Gerischer,J.J.Katz
- Sane,P.V., D.J.Goodchild, R.B.Park (1970) BBA 216,162-178
- Satoh,K., S.Katoh,A.Takamiya Plant Cell Physiol.11 (1970)
453-466
- Satoh,K. A.Takamiya, S.Katoh Plant Cell Physiol.15 (1974)
727-731
- Schliephake,W., W.Junge, H.T.Witt (1968) Z.Naturf.23b, 1571-1578

- Schwartz,G. (1978) J.Membr.Biol.43, 127-148
- Strickland,J.D.H. (1952) J.Am.Chem.Soc.74, 862-872
- Swader,J.A., W.Y.Chan Pest.Biochem.Physiol.5 (1975) 405-411
- Sundberg,R.J., R.B.Martin Chem.Rev.74 (1974) 471-518
- Struckmeier, P. (1976) Diplomarbeit, Frankfurt
- Trebst,A. (1974) Ann.Rev.Plant Phys.25,423-458
- Vallee,B.L., W.E.C.Wacker (1970) "The Proteins" Vol.V New York
- Vallejos,R.H., C.S.Andreo (1976) FEBS Lett. 61,1 95-99
- Velthuys,B.R., J.Amesz (1975) BBA 376, 162-168
- Vierke ,G., P.Struckmeier Z.Naturf.32c (1977) 605-610
- Vierke ,G., P.Struckmeier Z.Naturf.33c (1978) 266-270
- Walz,D., S.Schuldiner, M.Avron Eur.J.Biochem 22 (1971) 439-444
- Williams,R.J.P. (1976) Trends Biochem.Sci. 1, N222-N224
- Witt,H.T. (1979) BBA 505, 355-427
- Wraight,C.A., A.T.Crofts (1971) Eur.J.Biochem 19, 286-397

Abkürzungsverzeichnis

Asc	Natriumascorbat
Benz	Benzidin
CARB	Semicarbazid
Chl	Chlorophyll
CCCP	Carbonyl-Cyanid-m-Chlorophenylhydrazon
DABS	p-Diazoniumbenzolsulfonsäure
DAD	Diaminoduren
DBMIB	Dibromothymochinon
DCIP	2,6 - Dichlorophenol - Indophenol
DCMU	3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylharnstoff
DPC	1,5-Diphenylcarbazon
Fecy	$K_3(FeCN)_6$
MeV	Methylviologen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TES	N-Tris(hydroxymethyl)-methyl-2-aminoäthansulfon- säure
Simo	Silicomolybdat
PS I / II	Photosystem I / II

Lebenslauf

Name	Peter Struckmeier
Wohnung	6000 Frankfurt 1 Siesmayerstr. 7
geboren am	24.Okt.1948
in	Frankfurt a.M.
Familienstand	ledig
Eltern	Rudolf Struckmeier Flora Struckmeier, geb. Eyper
Geschwister	Margrit Kostka, geb. Struckmeier
Apr.1955 - Apr. 1959	Kirchnerschule und Diesterwegschule in Frankfurt
Apr.1959 - Jun.1967	Besuch des humanistischen Lessing- gymnasiums in Frankfurt, Abitur
Jul.1967 - Sept.1967	elektrotechn. Werkspraktikum bei Honeywell, Dörnigheim
Okt.1967 - Apr. 1968	Wehrdienst
Apr.1968 - Jan. 1969	Studium an der Universität Frankfurt
Jan.1969 - Okt. 1969	Zivildienst
Okt.1969 - Jul. 1976	Studium an der Universität Frankfurt, Diplom in Physik
Seit Okt.1976	wissenschaftlicher Mitarbeiter am Institut für biophysikalische Chemie, Dissertation unter Anleitung von Dr.G.Vierke

Meine akademischen Lehrer waren die Professoren:

H.Dänzer, U.Gerhard, W.Greiner, H.Haug, P.Junior, W.Martien-
ssen, W.Pohlitz, E.Schopper, W.Schwarz, J.Stauff und
Dr.G.Vierke

